

## THESIS / THÈSE

### MASTER IN BIOLOGY

#### Mise en évidence du rôle de CREB dans l'expression différentielle de gènes induite par l'inhibition mitochondriale dans des préadipocytes 3T3-L1

De Pauw, Aurélia

*Award date:*  
2004

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Mise en évidence du rôle de CREB dans l'expression différentielle de gènes  
induite par l'inhibition mitochondriale dans des préadipocytes 3T3-L1**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Licencié en Sciences biologique**

Aurélia De Pauw

Septembre 2004



## **Mise en évidence du rôle de CREB dans l'expression différentielle de gènes induite par l'inhibition mitochondriale dans des préadipocytes 3T3-L1**

DE PAUW Aurélia

### Résumé

De nombreuses pathologies mitochondriales ont pour origine des mutations ou abérations dans les génomes nucléaire et mitochondrial. La conséquence ultime d'un dysfonctionnement mitochondrial est une inhibition des phosphorylations oxydatives. Parmi la multitude de symptômes observés dans les syndromes causés par des perturbations de l'activité bioénergétique des mitochondries, on retrouve une perturbation du métabolisme des lipides. Un concept récent, qui s'étend à de nombreux organites non fonctionnels, suggère que la cellule eucaryote de mammifère est capable de répondre à un tel dysfonctionnement. De plus, la communication moléculaire rétrograde qui s'établit entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau induit souvent, in fine, un changement dans l'expression de nombreux gènes nucléaires. Au laboratoire, nous travaillons depuis plusieurs années sur la réponse de cellules préadipocytaires (3T3-L1) à une inhibition des phosphorylations oxydatives mitochondriales induite par un traitement chronique en présence d'antimycine A, un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire. Dans ces conditions, on observe un phénotype cellulaire caractérisé par l'accumulation de nombreuses petites vésicules de triglycérides dans le cytosol. De plus, le facteur de transcription CREB, une protéine qui joue un rôle déterminant dans la différenciation adipocytaire, est phosphorylé et activé dans les préadipocytes incubés en présence de l'inhibiteur. Dans ce travail, nous avons caractérisé le phénotype obtenu en étudiant l'expression différentielle de gènes et avons recherché le rôle de CREB dans l'acquisition de vésicules de triglycérides dans des cellules incubées en présence d'antimycine A. Dans un premier temps, nous avons exploité un damier à ADNc développé à l'URBC reprenant 89 sondes de capture pour des transcrits de gènes sélectionnés sur base de la littérature et connus pour leur fonction dans la différenciation adipocytaire ou adipogenèse. Des profils d'expression différentielle ont été établis sur des cinétiques et comparés à l'expression différentielle de gènes obtenue au cours de la différenciation des 3T3-L1 induite par un cocktail adipogénique et utilisé comme référence. Dans un deuxième temps, nous avons recherché le rôle éventuel du facteur de transcription CREB sur l'accumulation de triglycérides et sur la modification d'expression de gènes induites par l'antimycine A. Pour cela, nous avons exploité, validé et utilisé le système d'interférence par ARN (RNAi). Nous avons donc contribué à mieux comprendre l'effet d'une inhibition de l'activité mitochondriale sur l'expression différentielle de gènes dans des préadipocytes 3T3-L1 et avons pu montrer que l'inhibition de l'expression de CREB bloque l'accumulation de triglycérides dans des préadipocytes incubés en présence de l'inhibiteur métabolique de l'activité mitochondriale.

*Remerciements:*

*Ce mémoire prend finalement fin, après 7 mois de travail acharné et la contribution d'un grand nombre de personnes. Je voudrais les remercier brièvement.*

*Je remercie Monsieur le Professeur Remacle pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.*

*Je tiens à remercier Thiery Arnould, mon promoteur, pour son soutien et sa disponibilité mais également pour m'avoir appris à rédiger un texte scientifique et pour tout le temps consacré à la réalisation de ce mémoire (surtout à la fin !).*

*Merci Sébastien pour tes nombreuses explications toujours très claires et ton aide à la fin de ce mémoire. Elle fut véritablement précieuse.*

*Je suis éternellement reconnaissante à Andrée, sans qui j'aurai été noyée dans la complexité de l'analyse des résultats du microdamier. J'ai adoré nos longues discussions sur l'« adipochip », c'était très stimulant.*

*Je remercie également Edouard pour les inoubliables interrogations que nous avons tenté de résoudre.*

*Je voudrais également remercier tous les sourires et les encouragements reçus au labo.*

*Un très grand merci à tout(e)s mes ami(e)s et une pensée réconfortante pour ma compagne d'infortune. C'est (enfin) la dernière ligne droite, Audrey !*

*Un merci tout particulier à Quentin sa patience, ses encouragements et son aide au cours de ce mémoire.*

*Merci Maman et Papa, pour votre soutien inconditionnel tout au long de ces études. Elles prennent déjà fin...*

*Enfin, Merci mesdames et monsieur du jury pour le temps consacré à la lecture du manuscrit.*



# Liste des abréviations

$\psi\Delta\mu$	Potentiel de membrane mitochondriale
AA	Antimycine A
AAAT	Amino acid transporter
aa	acide aminé
AC	adenylate cyclase
ACC	Acetyl-Coenzyme A Carboxylase
actin	actin
Acrp30	Adipose complement-related protein 30
adipsin	adipsin
ADD1	Adipocyte Determination- and Differentiation-dependent factor 1
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine Diphosphate
ADRP	Adipose Differentiation-Related Protein
AFABP	adipocyte FABP
Agt	Angiotensinogen
AP-1	Activating Protein-1
aP2	adipocyte fatty acid binding protein
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ADNmt	ADN mitochondrial
AMPc	adenosine monophosphate cyclic
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
AMPKK	AMP-activated Protein Kinase Kinase
ANT	adenine nucleotide translocator
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomal
ARNt	Acide RiboNucléique de transfert
ARNdb	ARN double brins
ARNr18S	ARN ribosomal 18 S
ASP	Acylation Stimulating Protein
ATP	Adénosine Triphosphate
ATF-1	activating transcription factor-1
ATCC	American Tissue and Cell Collection
ATR I	Angiotensin receptor I
ATR II	Angiotensin receptor II
$\alpha$ 3-AR	$\alpha$ 3-Adrenergic Receptor
BD	benzodiazepine
bHLH-Zip	basic helix-loop-helix leucine zipper
BMI	body mass index
CACT	Carnitine Acyl-Carnitine Translocase
CAD	constitutive active domain
CaMK	Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase
CaMKK	Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase Kinase
CaM	Calmodulin
CaMK II	Calmodulin-dependent kinase II
CaMK IV	Calmodulin-dependent kinase IV
CAP	Cbl-Associated Protein
cav-1 $\square$	caveolin-1 $\square$
cav-2	caveolin-2
CBP	CREB-binding protein
CD	cyclophilin D
C/EBP $\square$	CCAAT/Enhancer-binding protein $\square$
C/EBP $\square$	CCAAT/Enhancer-binding protein $\square$
C/EBP $\square$	CCAAT/Enhancer-binding protein $\square$

<b>CHOP10</b>	C/EBP homologous protein 10
<b>CKII</b>	casein kinase II
<b>CL</b>	ATP Citrate Lyase
<b>CoA</b>	Coenzyme A
<b>Coll VI □ 2</b>	Collagen VI □ 2
<b>cpm</b>	coups par minute
<b>CPT-1l</b>	liver-carnitin palmitoyl-transferase-1
<b>CPT-1m</b>	muscle-carnitin palmitoyl-transferase-1
<b>CPT-2</b>	Carnitin palmitoyl-transferase-2
<b>CRE</b>	cAMP-responsive element
<b>CREM</b>	cAMP-responsive element modulator
<b>CREB</b>	cAMP-responsive element-binding protein
<b>Cst C</b>	Cystatin C
<b>Ct</b>	Cycle treshold
<b>Cyclin D3</b>	Cyclin D3
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>DEX</b>	dexamethasone
<b>DHAP</b>	Dihydroxy-Acétonephosphate
<b>DHAPAT</b>	Dihydroxyacetone-phosphate-acyl transferase
<b>DHG</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium High Glucose
<b>Diff</b>	Differenciation
<b>D.O.</b>	Densité Optique
<b>ECL</b>	Enhanced Chemiluminescence
<b>EDTA</b>	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>eIF2</b>	elongation initiation factor-2a
<b>eNOS</b>	Endothelial nitric oxide synthase
<b>ER□</b>	Endothelin receptor □
<b>ERK</b>	Extracellular Regulated Kinase
<b>ERK1/2</b>	extracellular signal-regulated kinase 1/2
<b>FAT/CD36</b>	fatty acid translocase/clusters differenciation 36
<b>FAAR</b>	fatty acid-activated receptor
<b>FCCP</b>	carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
<b>FAS</b>	Fatty acid synthase
<b>FAT</b>	Fatty Acid Translocase
<b>FATP</b>	Fatty Acid Transporter Protein
<b>FATP</b>	fatty acid transporter protein
<b>Fabp 4</b>	Fatty acid-binding protein 4
<b>FARE</b>	fatty acid-response elemnet
<b>FACS</b>	Fatty Acyl-CoA Shynthetase
<b>FFA</b>	free fatty acid
<b>GPD cyto</b>	Glycerol-phosphate deshydrogenase
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde-phosphate deshydrogenase
<b>GPDH</b>	glycerophosphate dehydrogenase
<b>GPD mito</b>	Glycerol-phosphate deshydrogenase
<b>GATA-2</b>	GATA-2
<b>GATA-3</b>	GATA-3
<b>GEF</b>	Guanine Exchange Factor
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GS</b>	Glycogen Synthase
<b>GSK-3□</b>	Glycogen Synthase Kinase -3□
<b>Gsn</b>	Gelsolin
<b>GLUT-4</b>	Glucose transporter 4
<b>Gyk</b>	Glycerol kinase

<b>Grb 2</b>	Growth factor receptor bound protein 2
<b>H<sup>+</sup></b>	Proton
<b>HEK293</b>	human embryonic kidney cells 293
<b>HSD-11□</b>	11-□ hydroxysterol dehydrogenase
<b>Hp</b>	Haptoglobin
<b>HFABP</b>	heart FABP
<b>HSP 60</b>	Heat shock protein 60
<b>HSP 84</b>	Heat shock protein 84
<b>HSP 86</b>	Heat shock protein 86
<b>HCNP</b>	Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide
<b>HSL</b>	Hormone-sensitive lipase
<b>HRP</b>	Horse Radish Peroxydase
<b>iNOS</b>	Inducible nitric oxide synthase
<b>IRS</b>	Insulin Receptor Substrate
<b>IGF-1</b>	insulin-like growth factor de type 1
<b>IGF-1</b>	Insulin-like Growth Factor-1
<b>IL-6</b>	Interleukin-6
<b>IR</b>	inverted repeat
<b>IF</b>	Immuno-Fluorescence
<b>JNK</b>	cJun NH <sub>2</sub> -terminal Kinase
<b>KID</b>	kinase inducible domain
<b>LDH</b>	lactate dehydrogenase
<b>LHON</b>	Leber's Hereditary Optic Neuropathy
<b>Leptin</b>	Leptin
<b>let-7</b>	lethal-7
<b>Leu</b>	leucine
<b><i>lin-4</i></b>	lineage-abnormal-4
<b>LSM</b>	Lipomatose Symétrique Multiple
<b>LPL-1</b>	Lipoprotein lipase 1
<b>LDS</b>	Lithium Dodécyl Sulfate
<b>I-PK</b>	L-pyruvate kinase
<b>Lys</b>	lysine
<b>mtCLIC/Clic4</b>	Chloride intracellular channel 4
<b>MAPKAP-K2</b>	MAP-Kinase-activated Protein-Kinase 2
<b>MMP-2</b>	Matrix metalloprotease-2
<b>MCAD</b>	Medium chain-acyl CoA dehydrogenase
<b>RAB3D</b>	member RAS oncogene family
<b>MMI</b>	Membrane mitochondrial externe
<b>MME</b>	Membrane mitochondrial interne
<b>MIX</b>	Methyl-3-IsobutylXanthine
<b>miRNA</b>	micro RNA
<b>MELAS</b>	Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes
<b>mtPTP</b>	mitochondrial permeability transition pore
<b>mtTFA</b>	mitochondrial transcription factor A
<b>MSK</b>	Mitogen- and Stress-activated Kinase
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MERRF</b>	Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers
<b>NADH</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
<b>NF-□B</b>	Nuclear Factor - □B
<b>NFATC2</b>	Nuclear factor of activated T cells
<b>NFATC4</b>	Nuclear factor of activated T cells
<b>ORO</b>	Oil Red O
<b>p110 □</b>	p110□
<b>p18</b>	p18



<b>PDK1/2</b>	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1/2
<b>p706SK</b>	p70 6S kinase
<b>PFA</b>	Paraformaldéhyde
<b>Plin A</b>	Perilipin A
<b>PPAR □</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor □
<b>PPAR □</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor□
<b>PIB</b>	Phosphatase Inhibitor Buffer
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PDK</b>	Phosphatidyl inositol Dependent Kinase
<b>PI-3 K</b>	Phosphatidyl Inositol-3 Kinase
<b>PEPCK-1</b>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase-1
<b>PLC</b>	PhosphoLipase C
<b>PTB</b>	PhosphoTyrosine Binding
<b>PEDF</b>	Pigment Epithelium-Derived Factor
<b>PAI-1</b>	Plasminogen activator-inhibitor-1
<b>PDGF</b>	Platelet Derived Growth Factor
<b>PVDF</b>	Polyvinylidène difluoride
<b>PTGS</b>	post-transcriptional gene silencing
<b>Pref-1</b>	Pre-adipocyte factor-1
<b>PIC</b>	Protease Inhibitor Cocktail
<b>PKA</b>	Protein Kinase A
<b>PKB</b>	Protein Kinase B
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>PP2C</b>	Protein Phosphatase 2C
<b>PP-1</b>	protein phosphatase-1
<b>PP-2</b>	protein phosphatase-2
<b>PDH</b>	Pyruvate Deshydrogenase
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>renin</b>	renin
<b>TGN</b>	réseau transgolgien
<b>resistin</b>	resistin
<b>RE</b>	Réticulum Endoplasmique
<b>RXR □</b>	Retinoïd-X-receptor □
<b>RXR □</b>	Retinoïd-X-receptor □
<b>RSK-2</b>	Ribosomal S6 kinase
<b>RHA</b>	RNA helicase A
<b>RNAi</b>	RNA interference
<b>PKR</b>	RNA-dependent protein kinase R
<b>RdRP</b>	RNA-dependent RNA polymerase
<b>RISC</b>	RNA-inducing silencing complex
<b>SPARC</b>	Secreted protein acidic and rich in cystein
<b>Ser</b>	serine
<b>SVF</b>	sérum de veau foetal
<b>Stat 6</b>	Signal transducer and activator of transcription 6
<b>S1P</b>	site-1 protease
<b>S2P</b>	site-2 protease
<b>Smad 3</b>	Smad 3
<b>siRNA</b>	small interfering RNA
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>SNAP</b>	soluble NSF attachment protein
<b>SH2</b>	Src Homology 2
<b>SCD-1</b>	Stearoyl-CoA desaturase-1
<b>SCD-2</b>	Stearoyl-CoA desaturase-2
<b>SREBP-1</b>	Sterol-responseive element-binding protein-1

<b>SDF-1</b>	Stromal cell-derived factor-1
<b>SDF-2</b>	Stromal cell-derived factor-2
<b>t-SNARE</b>	target SNAP receptor
<b>TBP</b>	TATA-box binding protein (TFIID)
<b>TZD</b>	thiazolidinedione
<b>Thr</b>	threonine
<b>TF</b>	Tissue Factor
<b>TGF-<math>\alpha</math>1</b>	Transforming-growth factor- $\alpha$ 1
<b>TIM</b>	translocase of the inner membrane
<b>TOM</b>	translocase of the outer membrane
<b>TBS</b>	Tris Buffer Saline
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor- $\alpha$
<b>Tyr</b>	tyrosine
<b>UCP-2</b>	Uncoupling protein-2
<b>VEGF A</b>	Vascular-endothelial growth factor
<b>VEGF B</b>	Vascular-endothelial growth factor
<b>VEGF C</b>	Vascular-endothelial growth factor
<b>v-SNARE</b>	vesicle SNAP receptor
<b>VDACC</b>	voltage-dependent calcium channel
<b>VSCCs</b>	voltage-sensitive Ca <sup>2+</sup> channels
<b>Wnt-10b</b>	Wnt-10b

# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 Métabolisme lipidique et dysfonctionnement mitochondrial</b>	<b>1</b>
1.1 Les nombreuses pathologies associées à un dysfonctionnement mitochondrial	1
1.1.1 Structure et fonctions de la mitochondrie	1
1.1.1.1 La structure mitochondriale	1
1.1.1.2 Les multiples fonctions de la mitochondrie	1
1.1.2 La complexité des maladies mitochondriales	2
1.1.3 La diversité des symptômes cliniques	3
1.1.3.1 Le syndrome MELAS	3
1.1.3.2 Le syndrome MERRF	3
1.1.4 Une perturbation du métabolisme lipidique associée à un dysfonctionnement mitochondrial	4
1.1.4.1 Le métabolisme des acides gras	4
1.1.4.1.1 Caractérisation des acides gras	4
1.1.4.1.2 Origine des acides gras	4
1.1.4.1.3 Transport des acides gras à travers les membranes biologiques	4
1.1.4.1.4 Synthèse des acides gras ou lipogenèse	5
1.1.4.1.5 $\beta$ -oxydation des acides gras ou lipolyse	6
1.1.4.1.6 Régulation du métabolisme des acides gras	6
1.1.4.2 La communication rétrograde mitochondrie-noyau initiée par un dysfonctionnement mitochondrial	7
1.1.4.3 Voies de signalisation induites par l'insuline et insulino-résistance	7
1.1.4.3.1 Les voies de transduction du signal initiées par l'insuline	7
1.1.4.3.2 La résistance à l'insuline	9
1.1.4.3.3 Diabète et dysfonctionnement mitochondrial	9
1.1.4.3.4 Diabète insulino-résistant et obésité	9
1.2 L'adipogenèse ou différenciation adipocytaire	10
1.2.1 Les tissus adipeux	10
1.2.2 La différenciation cellulaire des pré-adipocytes en adipocytes blancs	10
1.2.2.1 Caractérisation morphologique des pré-adipocytes 3T3-L1 et des adipocytes blancs	10
1.2.2.2 Caractérisation moléculaire de l'adipogenèse	11
1.2.2.2.1 Les inducteurs de l'adipogenèse	11
1.2.2.2.2 L'adipogenèse des 3T3-L1 au niveau moléculaire	11
<b>2 Le facteur de transcription CREB</b>	<b>13</b>
2.1 Structure et activation de la protéine CREB	13
2.1.1 La structure de CREB	13
2.1.2 Les voies de signalisation conduisant à l'activation ou à l'inhibition de l'action transactivatrice de CREB	13
2.1.2.1 La transduction du signal dépendante de l'AMPc	14
2.1.2.2 La transduction du signal initiée par des facteurs de croissance et par l'insuline	14
2.1.2.3 La transduction du signal dépendante du $\text{Ca}^{2+}$	14
2.1.3 L'action transactivatrice de CREB : le système CRE/CREB/CBP	15
2.2 Les fonctions du facteur de transcription CREB	15
2.2.1 La protéine CREB dans la différenciation adipocytaire	15
2.2.2 La protéine CREB lors d'un dysfonctionnement mitochondrial	15
<b>3 Outils d'analyse de l'expression génique</b>	<b>16</b>
3.1 Présentation brève des deux approches protéomique et transcriptomique	16
3.2 Analyse de l'expression génique par les microdamiers à ADN	17
3.2.1 Principe d'un microdamier à ADN	17
3.2.2 Présentation du microdamier « adipochip » utilisé dans ce travail	17
3.2.2.1 Hormones/Cytokines/Facteurs de croissance	17
3.2.2.2 Récepteurs membranaires	19
3.2.2.3 Transduction du signal	20
3.2.2.4 Facteurs de transcription et machinerie de transcription	20
3.2.2.5 Métabolisme des glucides et des lipides	20



3.2.2.6	Divers	21
<b>4</b>	<b>Le mécanisme RNA interference (RNAi)</b>	<b>22</b>
4.1	Bref historique de la découverte du mécanisme RNAi	22
4.2	Le fonctionnement du mécanisme RNAi	22
4.2.1	Mécanisme de dégradation du transcrit cible médié par les siRNA	22
4.2.2	Amplifications de l'effet RNAi	23
4.3	Le système RNAi, signification biologique et outil moléculaire	23
4.3.1	Signification biologique	23
4.3.2	Outil moléculaire	23
4.3.2.1	Les techniques de production de l'outil RNAi	23
4.3.2.2	Les limites de la technique RNAi	24
	<b>Contexte de la recherche, objectifs et stratégies</b>	<b>25</b>
1	Contexte de la recherche	25
2	Objectifs et stratégies	26
	<b>Matériel et Méthodes</b>	<b>27</b>
1	Type cellulaire utilisé	27
2	Culture et sous-cultures des pré-adipocytes 3T3-L1	27
3	Différenciation des pré-adipocytes murins 3T3-L1 en adipocytes	27
4	Incubation des pré-adipocytes murins en présence d'antimycine A, un inhibiteur des phosphorylations oxydatives	28
<b>5</b>	<b>Inhibition de l'expression génique de CREB par les siRNA</b>	<b>28</b>
5.1	Transfection des cellules avec les siRNA par la technique d'électroporation	28
5.1.1	Principe	28
5.1.2	Matériel et méthode	28
5.2	Transfection des cellules avec les siRNA par le jetSITM	29
5.2.1	Principe	29
5.2.2	Matériel et méthode	29
5.3	Marquage des siRNA à la fluorescéine	30
5.3.1	Principe	30
5.3.2	Matériel et méthode	30
5.4	Visualisation de la présence de siRNA dans des cellules 3T3-L1	30
5.4.1	Principe	30
5.4.2	Matériel et méthode	30
<b>6</b>	<b>Western blotting sur mini-gels NuPAGE pré-coulés et SDS-PAGE</b>	<b>31</b>
6.1	Principe	31
6.2	Matériel et méthode	32
6.2.1	Sous-culture	32
6.2.2	Transfection des siRNA	32
6.2.3	Préparation des échantillons	32
6.2.3.1	Principe	32
6.2.3.2	Matériel et méthode	32
6.2.4	Migration des échantillons	33
6.2.5	Transfert des échantillons sur une membrane de PVDF	33
6.2.6	Incubation de la membrane avec les anticorps et révélation	34
<b>7</b>	<b>Coloration des triglycérides à l'Oil Red O</b>	<b>34</b>
7.1	Principe	34
7.2	Matériel et méthode	34
<b>8</b>	<b>Hybridation d'ADNc sur le microdamier « adipochip »</b>	<b>35</b>
8.1	Principe	35
8.1.1	Contrôle de fixation négatif ou « buffer »	36
8.1.2	Contrôle de fixation positif ou « concentration curve detection »	36
8.1.3	Contrôle d'hybridation négatif	36

8.1.4	Contrôle d'hybridation positif	36
8.1.5	Les standards internes	36
8.1.6	Les gènes de maintenance ou « housekeeping genes »	37
8.2	Matériel et méthode	37
8.3	Extraction d'ARN total	38
8.3.1	Rétrotranscription des ARNm en ADNc	38
8.3.2	Hybridation sur le microdamier adipochip	39
8.3.3	Quantification et normalisation de l'expression génique	39
8.3.4	Mise au point de la quantité optimale d'ARN total engagée sur le microdamier	40
<b>9</b>	<b>Real-Time PCR</b>	<b>41</b>
9.1	Principe	41
9.2	Matériel et méthode	41
9.2.1	Choix des amorces	41
9.2.2	Extraction d'ARN total et rétrotranscription des ARNm en ADNc	41
9.2.3	L'amplification de l'ADNc par PCR en temps réel	42
9.2.4	Analyse des résultats	42

## **Résultats et Discussions** 44

### **1 Analyse de l'expression différentielle de gènes dans des pré-adipocytes incubés en présence d'un inhibiteur de la chaîne respiratoire mitochondriale ou d'un cocktail pro-adipogène** 45

1.1	Analyse comparative de l'expression différentielle de gènes dans des pré-adipocytes après 8 jours d'incubation en présence d'antimycine A ou d'un cocktail pro-adipogène	45
1.1.1	Comparaison de l'expression différentielle de gènes dans des 3T3-L1 incubés pendant 8 jours avec l'antimycine A ou le cocktail pro-adipogène	46
1.1.1.1	Hormones/cytokines/facteurs de croissance	46
1.1.1.2	Récepteurs membranaires	47
1.1.1.3	Protéines de stress	47
1.1.1.4	Transporteurs membranaires	47
1.1.1.5	Facteurs et machinerie de transcription	48
1.1.1.6	Protéines de structure	48
1.1.1.7	Cycle cellulaire	49
1.1.1.8	Métabolisme des glucides et des lipides	49
1.1.1.9	Transduction du signal	51
1.1.1.10	Divers	51
1.1.2	Quantification de l'expression des gènes non détectée sur le microdamier par PCR en temps réel	51
1.1.3	Confrontations des résultats obtenus par rapport à la littérature	53
1.2	Analyse des cinétiques d'expression de gènes dans des pré-adipocytes incubés en présence de l'inhibiteur mitochondrial ou du cocktail pro-adipogène	54
1.2.1	Premier profil d'expression	55
1.2.2	Second profil d'expression	55
1.2.3	Troisième profil d'expression	55
1.2.4	Quatrième profil d'expression	56
1.2.5	Cinquième profil d'expression	56
1.2.6	Sixième profil d'expression	56
1.2.7	Septième profil d'expression	56
1.2.8	Huitième profil d'expression	56
1.3	Etudes préliminaires visant à valider les résultats obtenus par l'« adipochip »	57
1.4	Essai d'interprétation des résultats préliminaires sur microdamier pour tenter d'expliquer l'accumulation de triglycérides induite par l'antimycine A dans des 3T3-L1	57

### **2 Etude du rôle de CREB dans l'accumulation des triglycérides induite par une inhibition mitochondriale dans les pré-adipocytes 3T3-L1** 59

2.1	Optimisation de l'outil siRNA dans des pré-adipocytes 3T3-L1	60
2.2	Recherche d'un rôle potentiel de CREB dans l'accumulation de triglycérides induite par un dysfonctionnement mitochondrial dans les 3T3-L1	62
2.2.1	Effet de l'inhibition de l'expression de CREB par le siRNA(3) sur le phénotype de pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A	62



2.2.1.1	Recherche d'une éventuelle modification de l'accumulation des triglycérides induite par l'antimycine A dans des 3T3-L1 transfectés avec le siRNA(3)	62
2.2.1.2	Conclusion	62
2.2.2	Effet de l'inhibition de l'expression de CREB par le siRNA(3) sur les changements d'expression de gènes observés dans des 3T3-L1 en réponse à l'antimycine A	63
2.2.3	Conclusion	65
<b>Conclusion et perspectives</b>		<b>66</b>
<b>Bibliographie</b>		<b>70</b>
<b>Annexe 1</b>		<b>76</b>
1	Valeurs obtenues pour l'expression différentielle de gènes au cours de la cinétique d'incubation des cellules 3T3-L1 en présence du cocktail adipogénique (Diff)	76
2	Valeurs obtenues pour l'expression différentielle de gènes au cours de la cinétique d'incubation des cellules 3T3-L1 en présence d'antimycine A (AA)	78

# Introduction



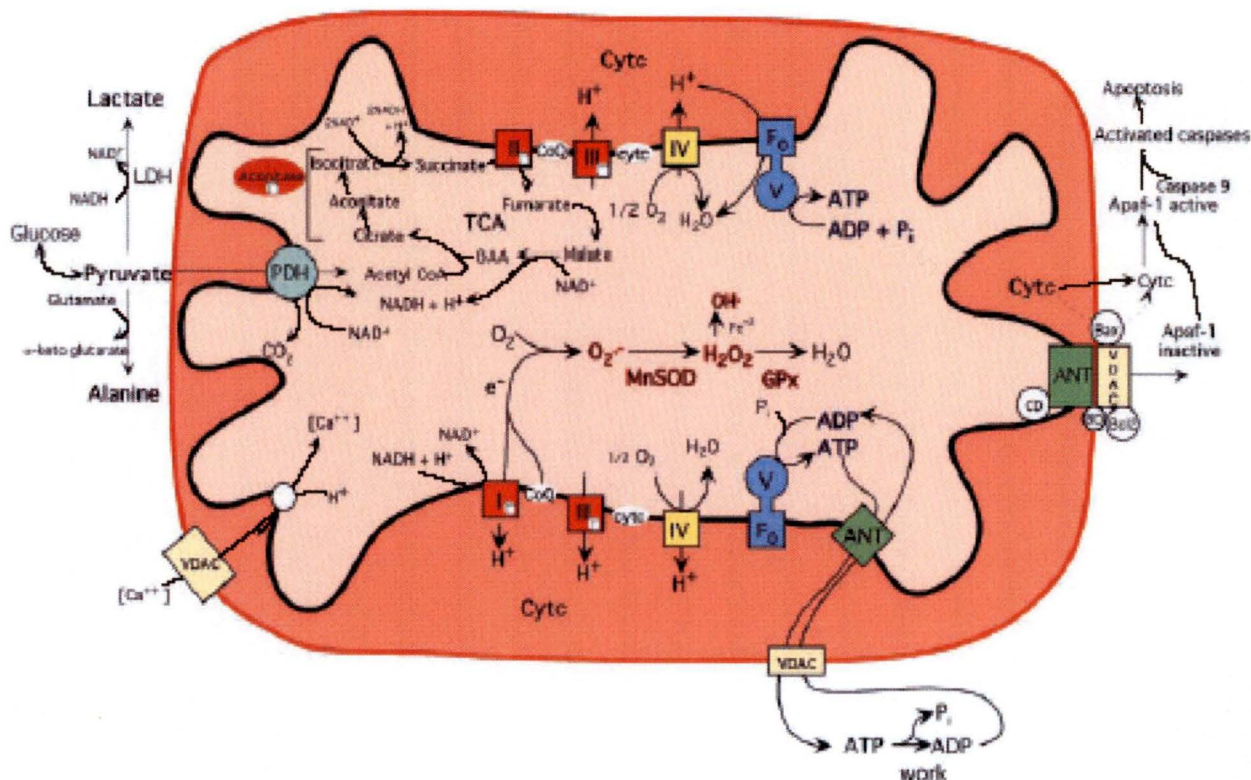


Figure 1.1. Schéma illustrant les relations entre les phosphorylations oxydatives mitochondriales et la production d'énergie, la génération de ROS comme l' $O_2^-$ , l' $H_2O_2$  et  $OH^-$ , et l'initiation de l'apoptose suite à l'activation du mPTP (mitochondrial permeability transition pore) formé par VDAC, ANT (adenine nucleotide translocator), Bax, Bcl2, le récepteur aux benzodiazépines (BD) et la cyclophiline D (CD) aux points de contact entre la MME et la MMI. Le pyruvate est transporté et métabolisé dans la mitochondrie par la PDH (pyruvate dehydrogenase) générant l'acétyl-CoA. Celui-ci entre dans le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) au niveau de l'oxaloacétate. La LDH (lactate dehydrogenase) convertit l'excès de pyruvate en lactate en utilisant du NADH. Les complexes enzymatiques qui constituent la chaîne respiratoire mitochondriale sont les complexes I (NADH : ubiquinone oxydoréductase), II (succinate : ubiquinone oxydoréductase), III (ubiquinol : cytochrome c oxydoréductase), IV (cytochrome c oxydase) et V (ATP synthase) (Wallace, 1999).

## Introduction

# 1 Métabolisme lipidique et dysfonctionnement mitochondrial

## 1.1 Les nombreuses pathologies associées à un dysfonctionnement mitochondrial

### 1.1.1 Structure et fonctions de la mitochondrie

#### 1.1.1.1 La structure mitochondriale

La mitochondrie est un organe constitué de deux membranes qui délimitent un espace intermembranaire et une matrice mitochondriale. Elle est donc subdivisée en quatre compartiments de structure assurant des fonctions différentes : les membranes mitochondriales externe et interne (MME et MMI) constituées de phospholipides et de protéines, et deux compartiments aqueux, l'espace intermembranaire et la matrice. La matrice renferme de nombreuses enzymes ainsi que plusieurs copies d'ADN mitochondrial (ADNmt). Le nombre de copies de l'ADNmt est fonction des exigences énergétiques de la cellule. Ainsi, un oocyte mature présente jusqu'à 100 000 copies d'ADNmt alors qu'un fibroblaste en compte seulement 700 (Wallace 1999)

#### 1.1.1.2 Les multiples fonctions de la mitochondrie

La mitochondrie est un organe ubiquiste impliqué dans des processus intracellulaires-clés (figure 1.1). Cet organe joue, en effet, un rôle central dans le métabolisme énergétique des cellules eucaryotes (assurant la production journalière d'environ 65 kg d'ATP chez l'homme), dans le métabolisme des lipides, des acides aminés et des stéroïdes, dans la biosynthèse de groupements hémiques, dans le cycle de l'urée et dans la synthèse des corps cétoniques (Graeber and Muller 1998); (Mootha, Bunkenborg et al. 2003). Elle est également impliquée dans certains processus apoptotiques, dans la régulation de l'homéostasie du calcium et constitue l'organe le plus important dans la production et la détoxification de radicaux libres dérivés de l'oxygène ou ROS (*reactive oxygen species*) (Wallace 1999). En outre, la mitochondrie forme un complexe réticulaire dynamique qui interagit avec d'autres constituants cellulaires, en particulier le cytosquelette et le réticulum endoplasmique (Butow and Avadhani 2004).

L'ADNmt (figure 1.2) est formé d'une double hélice d'ADN circulaire composée, chez l'homme, de 16 569 paires de bases. Ce génome a subi la perte d'un nombre important de gènes au cours de l'évolution et code, chez l'humain, pour 13 peptides constitutifs des complexes I, III, IV et V (figure 1.1), assurant les phosphorylations oxydatives, 2 ARNr et 22 ARNt mitochondriaux. Les autres constituants des complexes de la chaîne respiratoire, de la F0-F1 ATPase, les enzymes matricielles, les récepteurs et transporteurs des membranes externe et interne, les complexes multiprotéiques TOM (*translocase of the outer membrane*) et TIM (*translocase of the inner membrane*), les protéines découplantes de type UCPs (*uncoupling proteins*) sont tous codés par le génome nucléaire, synthétisés dans le cytosol par des ribosomes libres et importés dans la mitochondrie par les complexes TOM et TIM (Mootha, Bunkenborg et al. 2003).

Le génome mitochondrial ne code donc que pour environ 1 % des protéines mitochondriales (estimées à environ 1500) (Mootha, Bunkenborg et al. 2003). Ce génome ne





contient pas d'intron mais une région unique non codante, la boucle de déplacement, siège de la liaison des facteurs qui contrôlent l'expression et la réplication de l'ADNmt, comme le facteur de transcription mtTFA (*mitochondrial transcription factor A*) (Montoya, Perez-Martos et al. 1997). La présence et la particularité du génome mitochondrial et la structure de la mitochondrie appuient l'hypothèse d'une origine endosymbiotique de cet organe (probablement une  $\alpha$ -protéobactérie du genre *rickettsia*) (Gray, Burger et al. 2001).

La structure et le fonctionnement de cet organe sont donc dépendants de l'expression coordonnée des génomes nucléaire et mitochondrial. En conséquence, un dysfonctionnement mitochondrial acquis génétiquement peut être d'origine nucléaire ou mitochondriale. En effet, le taux de mutation dans l'ADNmt est environ dix fois plus élevé que dans l'ADN nucléaire, en raison notamment de systèmes de réparation de l'ADN moins efficaces, de l'absence d'intron et d'histone protectrice. De plus, l'ADNmt est situé à proximité de la chaîne respiratoire et donc du site de formation des ROS ((Wallace 1999); (Graeber and Muller 1998); (McLennan and Degli Esposti 2000)). Au sein du génome mitochondrial, on distingue les délétions et les mutations ponctuelles dans les gènes codant les ARNr et les ARNt qui affectent la synthèse des protéines mitochondriales de manière globale et les mutations de type substitution, insertion, délétion et duplication qui touchent essentiellement les gènes codant les 13 peptides de la chaîne respiratoire (DiMauro and Schon 2001). Actuellement plus de 50 mutations ponctuelles pathogènes (substitutions) et plusieurs centaines de réarrangements géniques (délétions et insertions) ont été identifiés dans un grand nombre de maladies dégénératives à transmission matrilineaire appelées « maladies mitochondriales » (figure 1.2). Ce taux de mutation élevé explique donc le polymorphisme très important de l'ADNmt (Wallace 1999).

### 1.1.2 La complexité des maladies mitochondriales

Les premiers cas cliniques et histologiques de myopathies mitochondriales ont été décrits dans les années 1960 (P. Lestienne, 1999). Depuis 10 ans, les études sur des patients atteints de pathologies associées à, ou causées par, un dysfonctionnement mitochondrial ont révélé la complexité génétique et phénotypique de ces maladies.

Lorsqu'une mutation, ponctuelle ou affectant la taille de l'ADNmt comme les délétions ou duplications, survient dans l'ADNmt, la cellule touchée contient des mitochondries où coexistent des ADNmt de type sauvage et muté. Cet état est appelé hétéroplasmie. Lors de la division d'une cellule hétéroplasmique, les ADNmt de type muté ou sauvage sont répartis de manière aléatoire dans les deux cellules filles. Au cours des divisions successives, cette ségrégation répllicative peut donc conduire une lignée cellulaire à une homoplasmie en ADNmt muté ou sauvage. Lorsque le pourcentage d'ADNmt mutant augmente, la capacité énergétique de la cellule diminue. Les symptômes, qui varient en fonction du tissu touché, apparaissent quand le seuil énergétique « minimum » nécessaire au bon fonctionnement de la cellule et perturbant la fonction de l'organe est dépassé. Dans de nombreux syndromes, le pourcentage d'ADNmt muté nécessaire pour observer les symptômes peut atteindre 80 à 90 % des molécules d'ADNmt.

De plus, il est intéressant de noter qu'une même mutation dans l'ADNmt peut produire des symptômes différents chez les membres d'une même famille, en fonction des pourcentages d'ADNmt mutés hérités par l'individu et des tissus affectés. Ainsi, la dystonie, caractérisée par des mouvements désordonnés, un retard mental et une stature courte, et la neuropathie optique héréditaire de Leber (*Leber's hereditary optic neuropathy* - LHON), caractérisée par une perte soudaine de la vue causée par la mort du nerf optique, peuvent être causées par la même mutation, une substitution G14459A dans le gène ND6 codant la sous-unité 6 de la NADH déshydrogénase (Wallace 1999). A l'inverse, différentes mutations dans



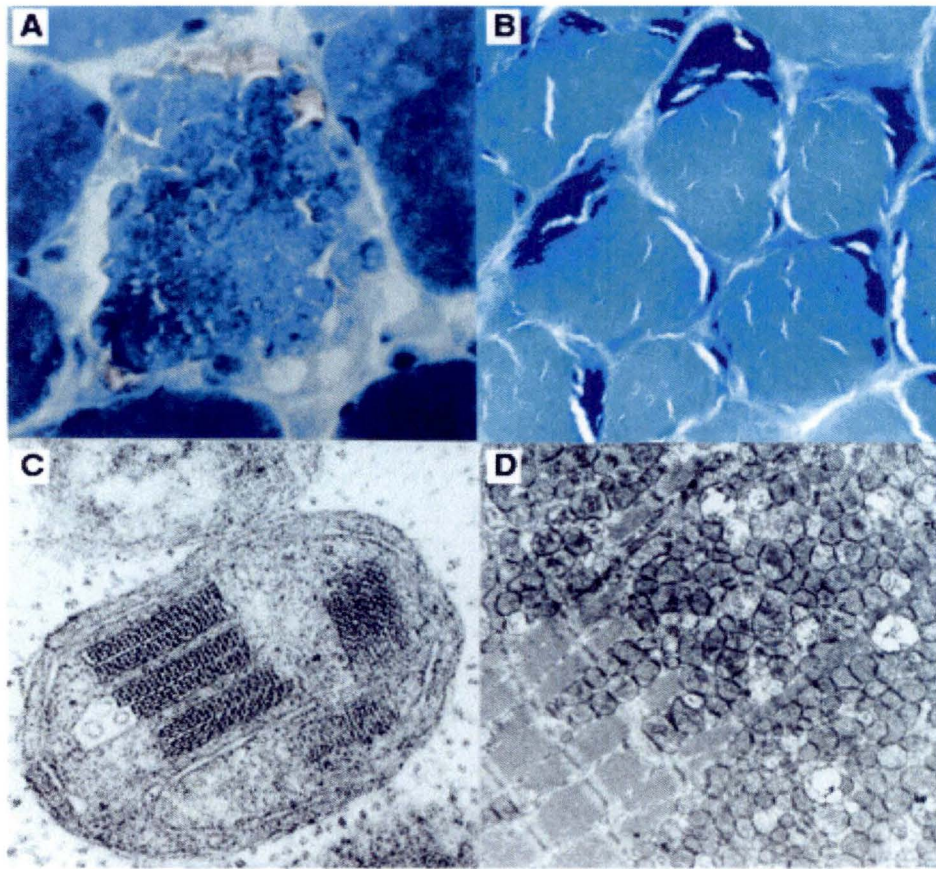


Figure 1.3. Coupes microscopiques (A et B) de fibres musculaires squelettiques colorées au Gomori ayant l'apparence RRF (ragged-red fibers) et micrographies électroniques (C et D) de mitochondries anormales ayant des inclusions paracrystallines qui illustrent la myopathie mitochondriale chez l'homme et chez la souris. (A) et (C) proviennent d'une biopsie de muscle squelettique prélevé chez un patient souffrant du syndrome MERRF (myoclonic epilepsy and ragged-red fibers) causé par une mutation dans le gène codant l'ARNt-lys du génome mitochondrial. (B) et (D) proviennent de muscles squelettiques prélevés chez une souris atteinte de myopathie mitochondriale et de cardiomyopathie hypertrophique résultant d'une inactivation ciblée du gène codant l'isoforme Ant1 (adenine nucleotide translocator 1), isoforme exprimée spécifiquement dans le muscle et le cœur (Wallace, 1999).



l'ADNmt peuvent produire des phénotypes similaires ; les syndromes MELAS (*mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*) et MERRF (*myoclonic epilepsy with ragged red fibers*) (présentés au paragraphe 1.1.3) en sont des exemples (Wallace 1999). Signalons encore que les mutations mitochondriales affectent principalement des cellules ayant un métabolisme élevé, telles que les cellules musculaires, les cellules neuronales et les hépatocytaires (Graeber and Muller 1998).

Enfin, des mutations dans le génome nucléaire peuvent également altérer les phosphorylations oxydatives, inhiber la transcription et/ou la réplication de l'ADNmt, ou encore perturber l'importation des protéines mitochondriales. Les patients atteints de ces maladies mitochondriales à transmission mendélienne présentent souvent des phénotypes similaires à ceux causés par des mutations dans le génome mitochondrial, puisque, *in fine*, ces mutations dans le génome nucléaire affectent les phosphorylations oxydatives (Wallace 1999).

Ces quelques considérations soulignent toute la complexité de la pathogenèse des maladies d'origine mitochondriale ainsi que la diversité des symptômes qui en découlent.

### 1.1.3 La diversité des symptômes cliniques

La biologie unique de la mitochondrie et son importance métabolique sont responsables d'une grande diversité dans les symptômes cliniques, dans la sévérité phénotypique et dans la complexité de la transmission des maladies mitochondriales (Poulton and Bindoff 2001). Parmi les maladies mitochondriales classiques, les syndromes MELAS et MERRF constituent les maladies mitochondriales les plus étudiées.

#### 1.1.3.1 Le syndrome MELAS

Le syndrome MELAS est caractérisé par une encéphalomyopathie mitochondriale qui se manifeste cliniquement par des maux de tête de type migraineux, des nausées, des vomissements et une hyperlactacidémie, un marqueur biochimique commun à de nombreuses maladies mitochondriales. La maladie MELAS est également caractérisée par des perturbations métaboliques comme le diabète de type II induit par une perturbation du métabolisme lipidique (paragraphe 1.1.4.3) (Graeber and Muller 1998). La mutation la plus commune chez les patients souffrant du syndrome MELAS est la substitution d'une adénine par une guanine à la position 3243 (A3243G) qui affecte le gène codant pour l'ARNt-leu mitochondrial (Graeber and Muller 1998). Les mutations dans un gène codant pour un ARNt mitochondrial induisent un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire résultant d'une diminution globale de la synthèse des protéines dans la matrice mitochondriale (Zancanaro, Sbarbati et al. 1990).

#### 1.1.3.2 Le syndrome MERRF

Les symptômes caractéristiques du syndrome MERRF sont une épilepsie myoclonique, une ataxie cérébelleuse et une myopathie de type *ragged-red fibers* : l'apparence de « fibres rouges déchirées » dans les muscles indique une prolifération et une accumulation des mitochondries sous le sarcolemme (figure 1.3). La mutation la plus commune retrouvée chez les patients souffrant du syndrome MERRF est la substitution A8344G qui affecte le gène codant pour l'ARNt-lys. Ces patients peuvent également développer des symptômes communs au syndrome de MELAS, tel que le diabète de type II (Graeber and Muller 1998). Certains patients atteints du syndrome MERRF souffrent parfois de lipomatoses symétriques multiples (LSM).

La LSM, encore appelée syndrome de Launois-Bensaude, se caractérise cliniquement par des dépôts de masses graisseuses hypertrophiées (« lipomes ») et non douloureuses



réparties de manière symétrique dans l'organisme. Ces dépôts sont généralement sous-cutanés et disposés autour du cou, des épaules et sur certaines parties du tronc. Un examen histologique des lésions révèle la présence de tissu adipeux non encapsulé avec des projections dans les structures environnantes. Les adipocytes constituant les lipomes sont multivésiculaires et plus petits que les adipocytes normaux. Leur activité métabolique est réduite. En effet, la lipolyse est défectueuse et le catabolisme des triglycérides est altéré dans ces cellules. Bien que les mécanismes de la pathogénicité restent inconnus, la présence d'une pathologie mitochondriale est souvent corrélée à l'apparition de la LSM chez certains patients. Ainsi, chez les patients souffrant du syndrome MERRF et qui développent une LSM, la prolifération de tissus adipeux et le stockage des lipides dans des lipomes seraient dûs à un trouble du métabolisme lipidique résultant d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Munoz-Malaga, Bautista et al. 2000). Plus récemment, (Nisoli, Regianini et al. 2002) ont proposé que la LSM aurait pour origine une altération de la réponse des adipocytes bruns à une stimulation par la noradrénaline conduisant à modifier la prolifération et la différenciation de ces cellules (Nisoli, Regianini et al. 2002).

Les pathologies mitochondriales résultant d'un dysfonctionnement mitochondrial peuvent donc s'accompagner d'une perturbation du métabolisme lipidique qui se caractérise chez les patients, par une redistribution systémique des graisses et une lipidémie élevée.

#### **1.1.4 Une perturbation du métabolisme lipidique associée à un dysfonctionnement mitochondrial**

##### *1.1.4.1 Le métabolisme des acides gras*

###### 1.1.4.1.1 Caractérisation des acides gras

Un acide gras est constitué d'une longue chaîne hydrocarbonée terminée par un groupe carboxylique. On distingue les acides gras à courte, moyenne ou longue chaîne, saturés (toutes les liaisons carbone-carbone sont des liaisons covalentes simples), ou mono/poly-insaturés (avec respectivement une ou plusieurs doubles liaisons). Les acides stéarique (18 :0) et palmitique (16 :0) sont les acides gras saturés naturels les plus abondants et l'acide oléique (18 :1) constitue l'acide gras mono-insaturé le plus abondant. Les mammifères ne synthétisent pas certains acides gras essentiels pour leur survie et leur croissance. Par exemple, l'acide linoléique (18 :2), précurseur de l'acide arachidonique chez les mammifères, et l'acide  $\gamma$ -linolénique (18 :3) sont prélevés dans l'alimentation d'origine végétale.

###### 1.1.4.1.2 Origine des acides gras

Les acides gras utilisés dans les différents tissus de l'organisme peuvent provenir des graisses alimentaires ou de la mobilisation des triglycérides à partir des tissus adipeux.

Les produits de la digestion des graisses alimentaires réalisée au niveau du duodénum par des lipases et des estérases pancréatiques, sont absorbés au niveau des entérocytes, transformés en triglycérides et sécrétés sous forme de chylomicrons. Ces particules sont libérées dans la circulation sanguine et transportées vers le foie. Les triglycérides sont alors acheminés vers les différents tissus sous forme de lipoprotéines. Pour leur incorporation, les triglycérides sont d'abord partiellement hydrolysés par la LPL (*lipoprotein lipase*) en glycérol et acides gras au niveau des cellules endothéliales des capillaires qui irriguent les tissus musculaires et adipeux. Le glycérol est acheminé vers le foie où il est transformé en dihydroxyacétone phosphate, un intermédiaire de la glycolyse, par la glycérol kinase (Gyk) et la GPDH (*glycerophosphate dehydrogenase*) (Duplus, Glorian et al. 2000).

###### 1.1.4.1.3 Transport des acides gras à travers les membranes biologiques

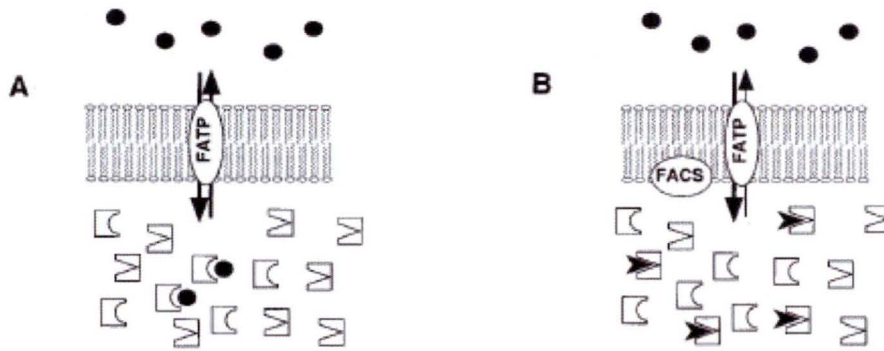


Figure 1.4. Modèle proposé pour expliquer la coordination des activités de la FATP et de la FACS dans le transport des acides gras à longue chaîne. Lorsque la FACS (long chain fatty acyl-CoA synthetase) n'est pas présente en membrane plasmique (A), la FATP (fatty acid transporter protein) facilite le transport bidirectionnel des acides gras et les acides gras sont directement complexés à la FABP (fatty acid binding protein) dans le cytosol. Lorsque la FACS est présente en membrane plasmique (B), les acides gras importés sont estérifiés et se lient aux ACBPs (acyl-CoA binding proteins) (Gargiulo et al., 1999).

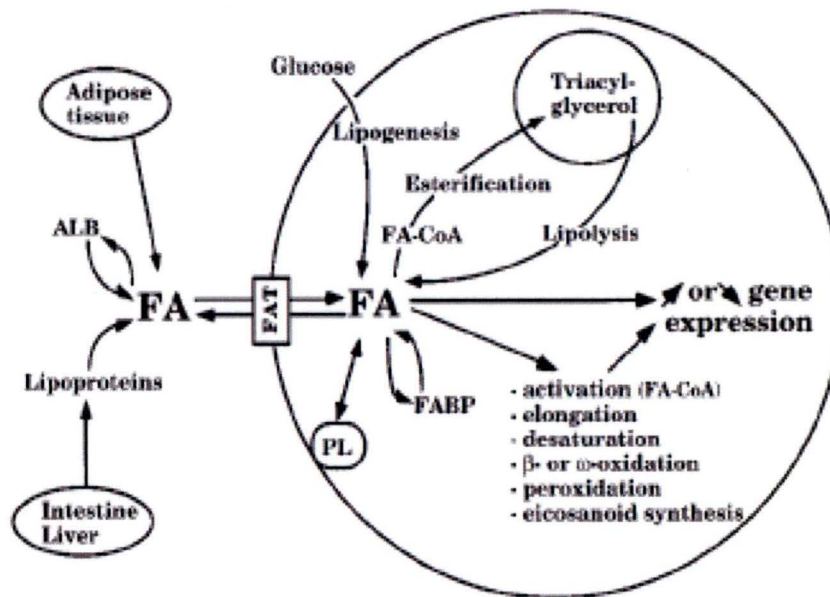


Figure 1.5. Schéma général et simplifié du métabolisme des acides gras qui illustre les voies d'ancrage, d'activation, d'estérification en triglycérides, de lipolyse et le contrôle de l'expression de gènes cibles exercé par le taux d'acides gras intracellulaires. Les acides gras participent aussi à la synthèse des phospholipides membranaires, à l'acylation des protéines à ancrage membranaire et à la synthèse des eicosanoïdes (FA : fatty acid ; PL : phospholipid ; ALB : albumine ; FA-CoA : fatty acyl-CoA ; FABP : fatty acid binding protein ; FAT : fatty acid transporter) (Duplus et al., 2000).



Le transport des acides gras à travers les membranes biologiques s'effectue par adsorption, flip-flop et résorption (diffusion passive) ou un transport médié par des protéines membranaires spécifiques (diffusion facilitée).

Cinq transporteurs membranaires permettant la diffusion facilitée des acides gras ont été identifiés : la FAT/CD36 (*fatty acid translocase/clusters differentiation 36*), l'ADRP (*adipose differentiation related protein*), la FABP (*fatty acid binding protein*), la FATP (*fatty acid transporter protein*) et la FACS (*long chain fatty acyl-CoA synthetase*).

La FAT/CD36 est une protéine membranaire de vésicules intracellulaires transloquées en membrane plasmique des cellules du muscle squelettique suite à une contraction musculaire (Bonnen, Story et al. 2000). L'ADRP est exprimée dans la membrane plasmique des pré-adipocytes en début de différenciation adipocytaire et se retrouve associée aux vésicules de triglycérides dans les adipocytes matures. En tant que transporteur membranaire, elle régulerait uniquement l'entrée des acides gras à longue chaîne. Les FABP sont insérées dans la membrane plasmique sous forme de tonneau  $\beta$  flanqués de courtes hélices  $\alpha$  responsables de la liaison des acides gras. L'isoforme HFABP (*heart FABP*) est ubiquiste et présente une affinité élevée pour les acides gras saturés tandis que l'isoforme AFABP (*adipocyte FABP*) est exprimée dans les adipocytes et les macrophages et ne présente pas de spécificité de liaison pour des acides gras particuliers (Gargiulo, Stuhlsatz-Krouper et al. 1999). La FATP semble assurer le transport bidirectionnel des acides gras à longue chaîne à travers la membrane plasmique des adipocytes (figure 1.4). L'efficacité d'incorporation de ces acides gras à longues chaînes est fonction de l'action coordonnée de la FATP et de la FACS (figure 1.4). En effet, l'absence ou la présence de la FACS dans la membrane plasmique régule la liaison des acides gras à un transporteur cytosolique tel que respectivement la FABP ou l'ACBP (Gargiulo, Stuhlsatz-Krouper et al. 1999). Les molécules FABP sont de petites protéines cytosoliques qui se lient aux longues chaînes d'acides gras avec une affinité élevée (Duplus and Forest 2002). Leur rôle est essentiellement de transporter les acides gras dans le cytosol et de les diriger vers les différentes enzymes qui les métaboliseront. La protéine FABP-4, ou aP2, est un membre de la famille des FABP intracellulaires. Elle est fortement exprimée dans les adipocytes (Uysal, Scheja et al. 2000).

#### 1.1.4.1.4 Synthèse des acides gras ou lipogenèse

La lipogenèse et la lipolyse sont deux voies métaboliques qui se déroulent simultanément et principalement dans le tissu adipeux. Elles régulent les quantités de triglycérides accumulés dans les adipocytes (figure 1.5).

Les précurseurs de la synthèse des acides gras proviennent de l'oxydation partielle du glucose dans la glycolyse (figure 1.6) et de la  $\beta$ -oxydation des acides gras en acétyl-CoA. Dans cette voie de synthèse, l'acétyl-CoA s'accumule dans la mitochondrie et entre dans le cycle de Krebs où il est converti en citrate et transporté sous cette forme dans le cytosol. L'ATP citrate lyase cytosolique (CL) régénère alors l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate (un intermédiaire du cycle de Krebs). Les molécules d'acétyl-CoA sont alors carboxylées en malonyl-CoA par l'ACC (*acetyl-CoA carboxylase*), la principale enzyme régulatrice de la voie de synthèse des acides gras. La FAS (*fatty acid synthase*) catalyse ensuite la formation de l'acide gras par estérification du malonyl-CoA en utilisant de l'acétyl-CoA et du NADPH. Le principal acyl-CoA produit par la FAS est l'acide palmitique ou palmitoyl-CoA (16 :0), dont une grande partie est convertie, dans le réticulum endoplasmique, en acide stéarique ou stearoyl-CoA (18 :0) grâce à l'action d'élongases (Moon, Shah et al. 2001). Les désaturases telles que la SCD-1 (*stearoyl-CoA desaturase-1*) catalysent finalement la formation d'acides gras insaturés comme l'acide oléique (18 :1n-9) à partir des acyl-CoA estérifiés.

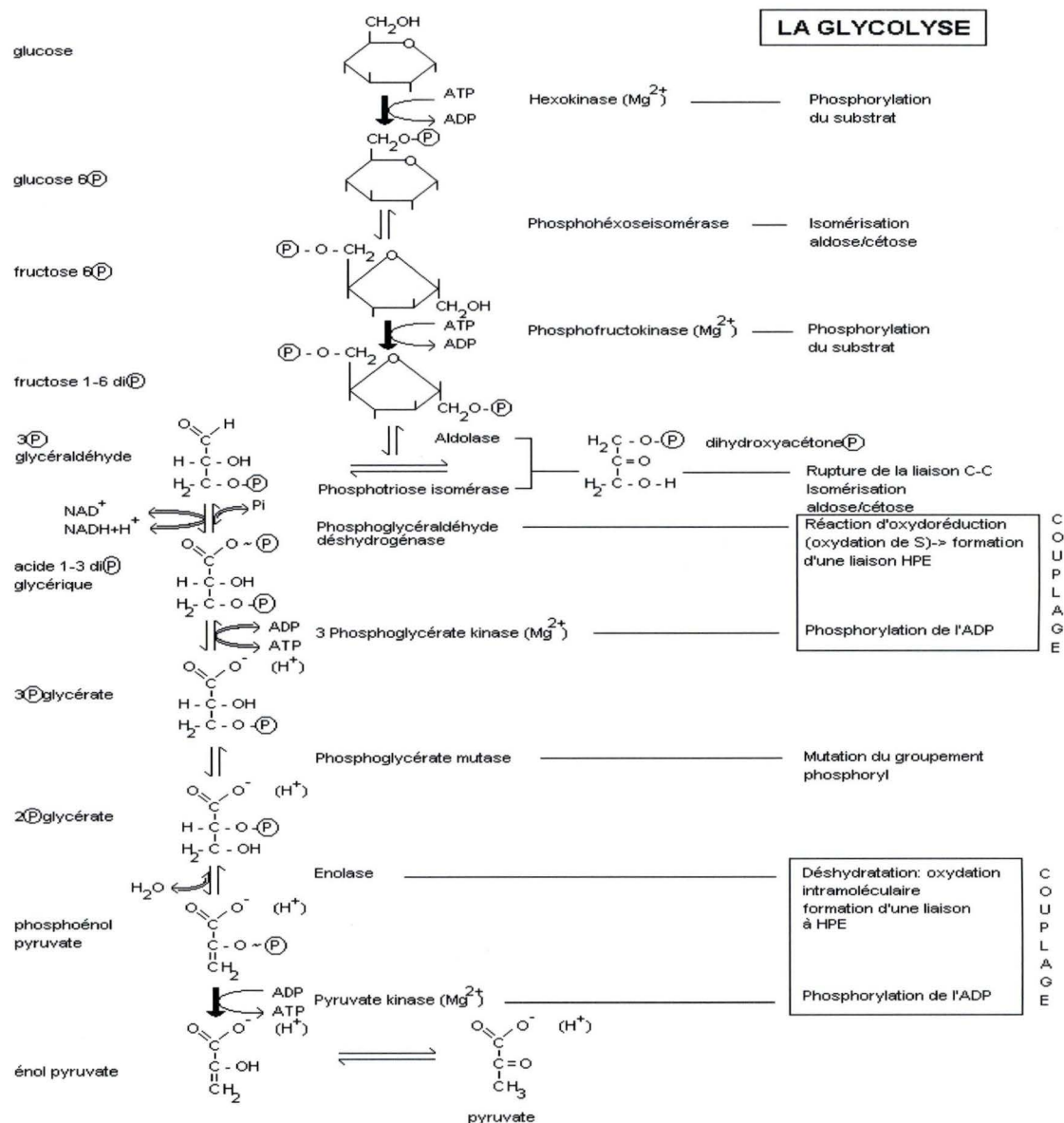


Figure 1.6. Représentation schématique des multiples étapes de la glycolyse. <http://www.ac-rouen.fr>



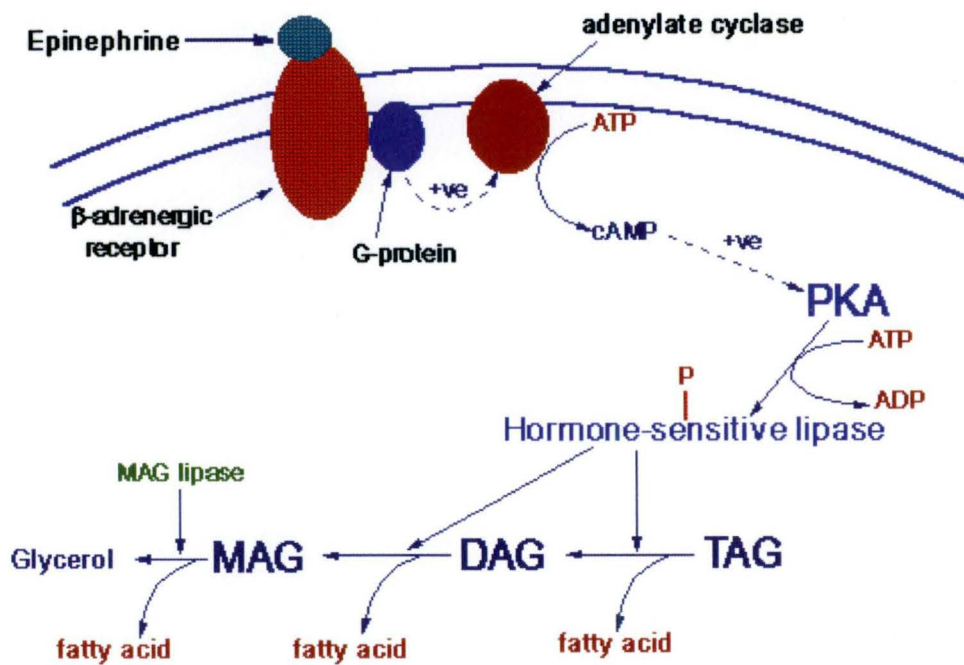


Figure 1.7. Schéma illustrant la voie de signalisation dépendante de la PKA dans la mobilisation des triglycérides induite par un stimulus hormonal (épinéphrine) dans les adipocytes.

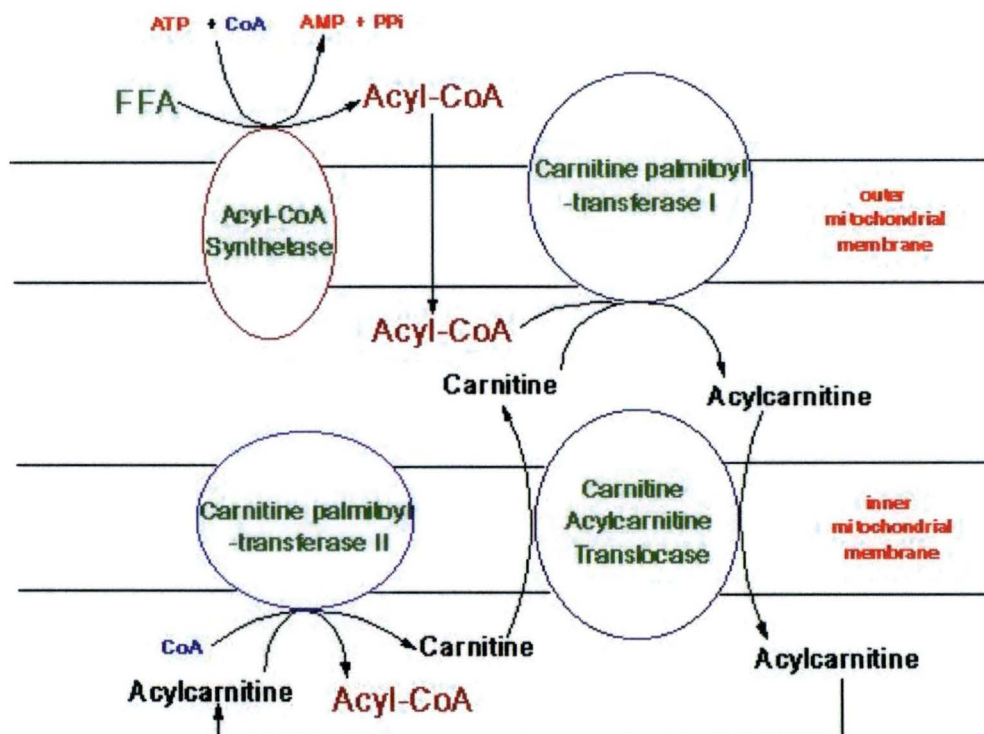


Figure 1.8. Représentation schématique du système CPT (d'après Michael W. King, 1997). Le premier composant du système est la CPT-1, présente dans la membrane mitochondriale externe, qui catalyse la transestérification du groupement acyl sur la carnitine et permet ainsi son passage dans l'espace intermembranaire. Le complexe acylcarnitine traverse ensuite la membrane interne de la mitochondrie par une translocase spécifique, l'ACT (acylcarnitine translocase), puis est clivé par la CPT-2 associée au feuillet interne de la membrane mitochondriale interne en acyl-CoA et carnitine (McGarry et al., 1983 ; Esser et al., 1996).

Les triglycérides sont des graisses neutres qui résultent de l'estérification d'une molécule de glycérol avec trois molécules d'acides gras et s'accumulent principalement dans les tissus adipeux des mammifères.

#### 1.1.4.1.5 $\beta$ -oxydation des acides gras ou lipolyse

La  $\beta$ -oxydation des acides gras est un processus très exergonique. En effet, les acides gras contiennent de nombreux carbones réduits et libèrent donc beaucoup d'énergie lors des réactions d'oxydation peroxisomale et/ou mitochondriale (38 kJ/g).

La mobilisation des triglycérides dans les tissus adipeux nécessite leur hydrolyse préalable en glycérol et acides gras libres par la HSL (*hormone-sensitive lipase*) activée par une voie de signalisation dépendante de la PKA, elle-même activée par la liaison d'un ligand sur un récepteur de type  $\beta$ -adrénergique (figure 1.7). Les acides gras libres peuvent alors être libérés dans la circulation sanguine et transportés par l'albumine vers les différents tissus, ou dégradés par la  $\beta$ -oxydation pour fournir de l'énergie.

La  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras débute par la formation d'une liaison thioester entre le carboxyle de l'acide gras et le groupement thiol du coenzyme A : une réaction catalysée par l'acyl-CoA synthétase et qui active l'acide gras et permet sa translocation dans la matrice mitochondriale par le système CPT (*carnitine palmitoyl transferase*) (figure 1.8). Ce système est composé de la CPT-1 insérée dans la membrane mitochondriale externe, de l'acylcarnitine translocase et de la CPT-2, toutes deux insérées dans la membrane mitochondriale interne. La CPT-2 est une carnitine palmitoyl-transférase dont l'action permet de régénérer les acides gras préalablement transestérifiés sur la carnitine par la CPT-1 sous forme d'acyl-CoA à longues chaînes (Brown, Hill et al. 1997).

Le processus de dégradation des acyls-CoA par la  $\beta$ -oxydation se déroule par des cycles successifs qui comportent quatre étapes. Une première oxydation est assurée par une l'acyl-CoA déshydrogénase, la MCAD (*medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase*), suivie d'une hydratation de la double liaison par l'énoyl-CoA hydratase. Une seconde oxydation est catalysée par la 3-L-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase suivie du clivage d'un acétyl-CoA catalysé par une thiolase.

#### 1.1.4.1.6 Régulation du métabolisme des acides gras

Le métabolisme des acides gras est régulé par des mécanismes à court et à long terme pour maintenir une homéostasie énergétique.

L'ACC, qui catalyse la synthèse de malonyl-CoA lors de la lipogenèse, est une enzyme clé de la régulation, à court terme, du métabolisme des acides gras. En effet, le malonyl-CoA est un inhibiteur allostérique de la CPT-1, empêchant ainsi l'importation des acides gras dans la mitochondrie et donc leur dégradation. De plus, l'ACC est le substrat de l'AMPK (*5'-AMP-dependent protein kinase*), une kinase agissant comme un senseur de l'état énergétique de la cellule. En effet, suite à un stress métabolique qui induit une augmentation du ratio AMP/ATP intracellulaire, cette kinase trimérique de type Ser/Thr est activée et la phosphorylation inhibitrice de l'ACC sur la Ser79 diminue la synthèse de malonyl-CoA et donc augmente la  $\beta$ -oxydation des acides gras suite à la levée de l'inhibition exercée par le malonyl-CoA sur la CPT-1.

La régulation de l'expression génique par les acides gras constitue une régulation à long terme du métabolisme des acides gras qui est assurée par différents mécanismes (figure 1.9). Ainsi, les acides gras poly-insaturés sont capables de réprimer l'expression des gènes codant la FAS, l'ACC, la CL, la SCD-1 et le transporteur du glucose GLUT4. De plus, les gènes codant de nombreux marqueurs du phénotype adipocytaire tels que la FACS, la LPL, la CPT, GLUT1 et GLUT4 sont induits par différents acides gras, comme l'acide arachidonique,



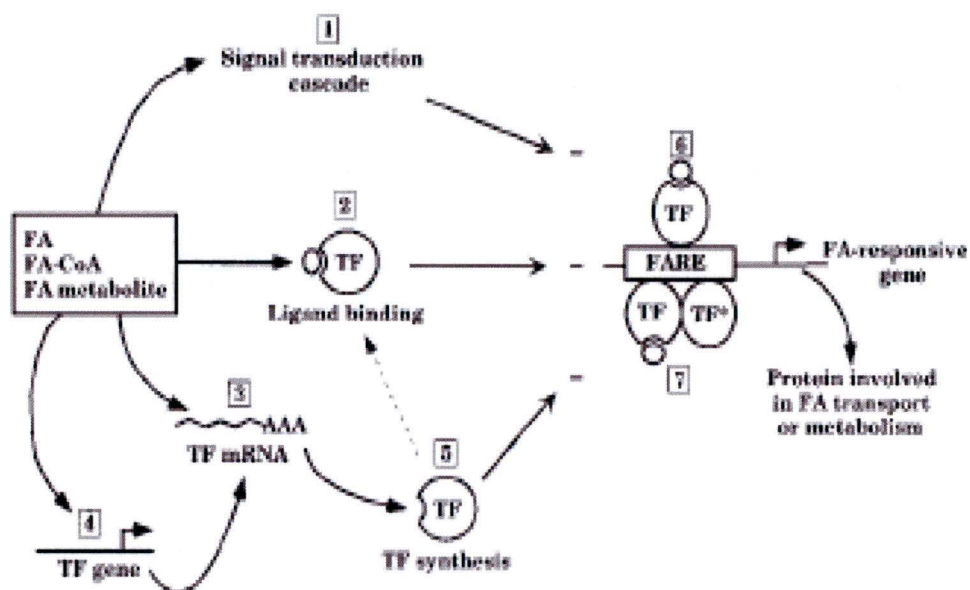


Figure 1.9. Schéma illustrant la régulation de l'expression génique par les acides gras. Les acides gras peuvent activer des voies de signalisation induite qui mènent à une modification structurale de la conformation de facteurs de transcription par des mécanismes impliquant des phosphorylations/déphosphorylations et donc un changement de l'activité de ces facteurs. Les acides gras peuvent également jouer le rôle de ligands de facteurs de transcription pour les activer ou les inhiber. Ils peuvent aussi altérer la stabilité de leur ARNm ou modifier leur transcription. Les facteurs de transcription liés aux acides gras reconnaissent, sous forme homo ou hétérodimérique, une séquence consensus FARE (fatty acid-response element), située dans la région promotrice des gènes cibles (Duplus et al., 2000).

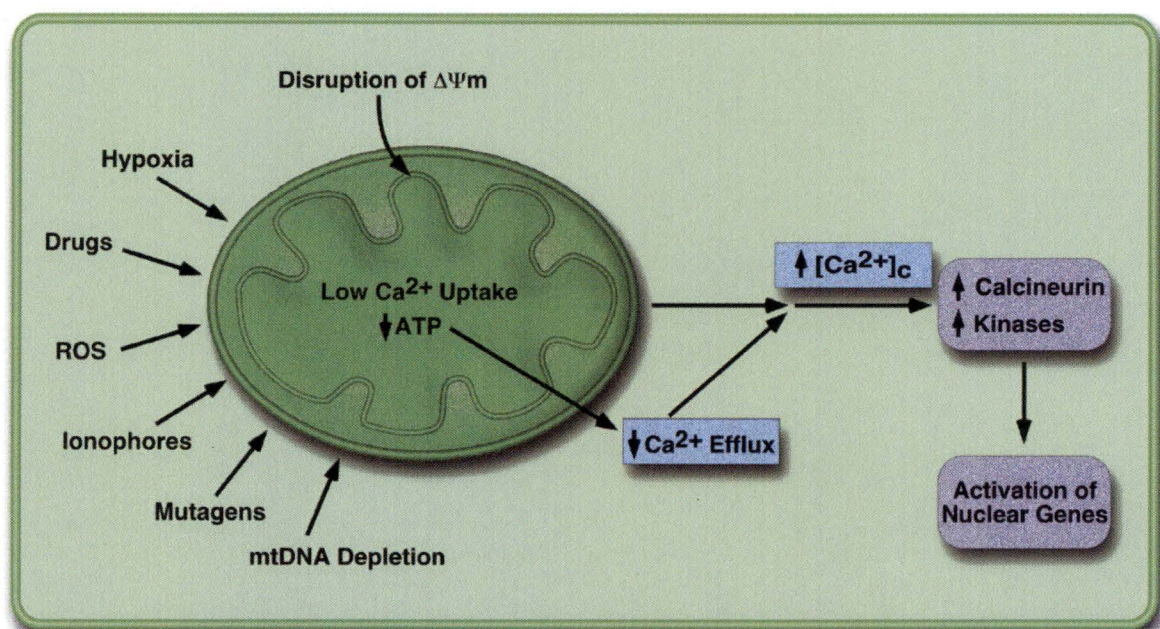


Figure 1.10. Schéma illustrant la communication rétrograde entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau initiée par différents stress qui induisent une diminution de la production d'énergie et une augmentation de la concentration cytosolique libre en  $\text{Ca}^{2+}$ . L'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire permet l'activation ou l'inhibition de phosphatases comme la calcineurine et/ou différentes kinases qui conduisent à modifier l'expression de gènes nucléaires (Butow and Avadhani, 2004).



un ligand du facteur de transcription PPAR $\gamma$  impliqué dans le contrôle de l'expression de ces gènes.

Dans ce travail, nous avons étudié la modification de l'expression de gènes dans des pré-adipocytes 3T3-L1 en réponse à une inhibition de l'activité respiratoire mitochondriale par un inhibiteur métabolique comme l'antimycine A (AA), qui inhibe le complexe III de la chaîne de transporteurs d'électrons. On sait en effet, que le dysfonctionnement mitochondrial induit une réponse cellulaire appelée « communication rétrograde » caractérisée par l'activation de nombreuses voies de signalisation dans la cellule (Butow and Avadhani 2004).

#### *1.1.4.2 La communication rétrograde mitochondrie-noyau initiée par un dysfonctionnement mitochondrial*

Le dysfonctionnement mitochondrial induit donc des voies de signalisation qui activent ou inhibent l'action transactivatrice de certains facteurs de transcription dans le cadre d'une « communication moléculaire rétrograde » entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau. La perturbation de l'activité énergétique des mitochondries peut donc modifier l'expression de certains gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales ou non ((Arnould, Vankoningsloo et al. 2002); (Butow and Avadhani 2004))

Mécanistiquement, une dissipation du potentiel de membrane mitochondrial résultant d'une déplétion partielle en ADNmt, une incubation des cellules avec des molécules découplantes comme le FCCP (*carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*), de l'action des ionophores, de l'hypoxie ou encore d'une production accrue de ROS, induit une diminution de la production d'ATP et entraîne une augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> cytosolique libre (figure 1.10). L'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> cytosolique active alors de nombreuses voies de signalisation impliquant des phosphatases comme la calcineurine et des kinases comme la MAPK, la PKC et la CaMK qui modifient l'activité de facteurs de transcription (CREB, NFAT, ...) et donc l'expression de gènes nucléaires en réponse au dysfonctionnement mitochondrial (pour une revue (Butow and Avadhani 2004)). Une de ces voies de signalisation a été identifiée au laboratoire : l'activation de la CaMKIV (*Calmodulin Kinase IV*) en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial associé à une augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> cytosolique augmente l'activité du facteur de transcription CREB (*cAMP-responsive element binding protein*) suite à sa phosphorylation sur la Ser133 (Arnould, Vankoningsloo et al. 2002).

On a vu au paragraphe 1.1.3 que certaines pathologies mitochondriales s'accompagnent d'une perturbation du métabolisme lipidique, caractérisée, entre autres, par une redistribution systémique des graisses et une lipidémie élevée. Ces deux conditions peuvent induire des phénomènes de résistance à l'insuline, et donc le développement d'un diabète de type II. Comme, dans ce travail, nous avons utilisé un modèle de référence portant sur la différenciation adipocytaire des 3T3-L1 induite par un cocktail pro-adipogène, composé notamment d'insuline, nous allons donc nous intéresser aux voies de signalisation induites par l'insuline et aux mécanismes responsables de la résistance à l'insuline.

#### *1.1.4.3 Voies de signalisation induites par l'insuline et insulino-résistance*

##### 1.1.4.3.1 Les voies de transduction du signal initiées par l'insuline

La sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas est induite par l'entrée du glucose médiée par GLUT2 (figure 1.11). Le pyruvate produit par la glycolyse est alors importé dans la mitochondrie, transformé en acétyl-CoA et entre dans le cycle des acides tricarboxyliques. La production d'équivalents réducteurs sous forme de NADH par ce cycle permet le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et la production d'ATP. Un ratio ATP/ADP cytosolique élevé provoque une dépolarisation de la membrane plasmique et



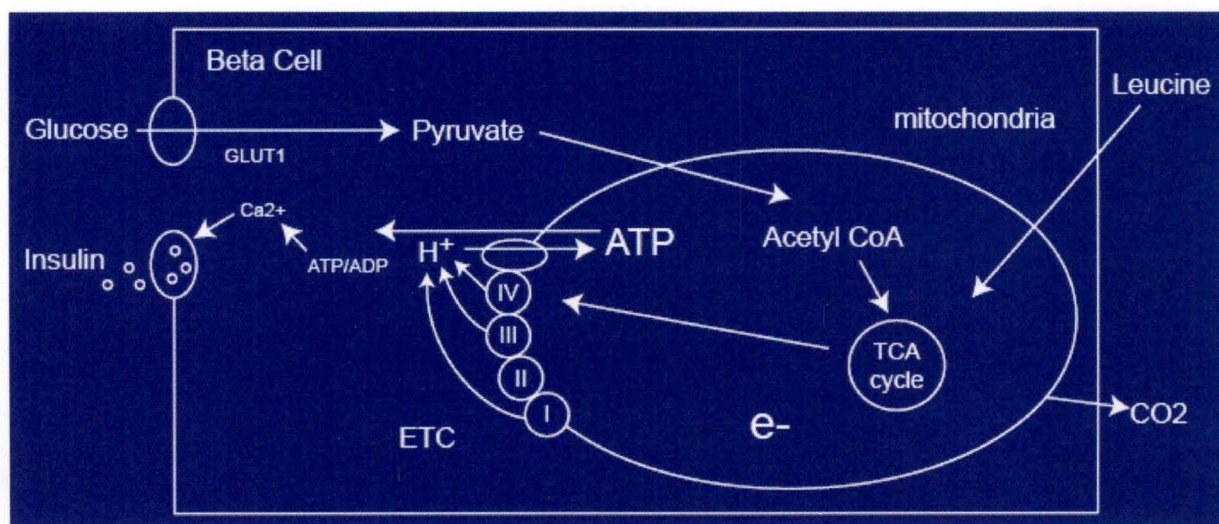


Figure 1.11. Schéma illustrant la libération d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas suite à l'incorporation du glucose (Lamson and Plaza, 2002).

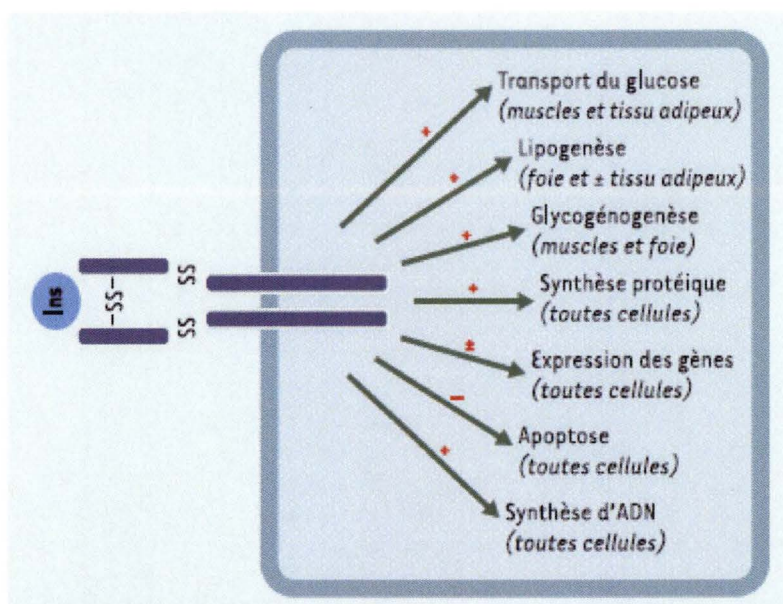


Figure 1.12. Effet pléiotrope de l'insuline. En se fixant sur son récepteur, l'insuline exerce ses effets dans de nombreux tissus cibles, dont les plus importants sont le foie, les muscles et le tissu adipeux (Capeau, 2003).



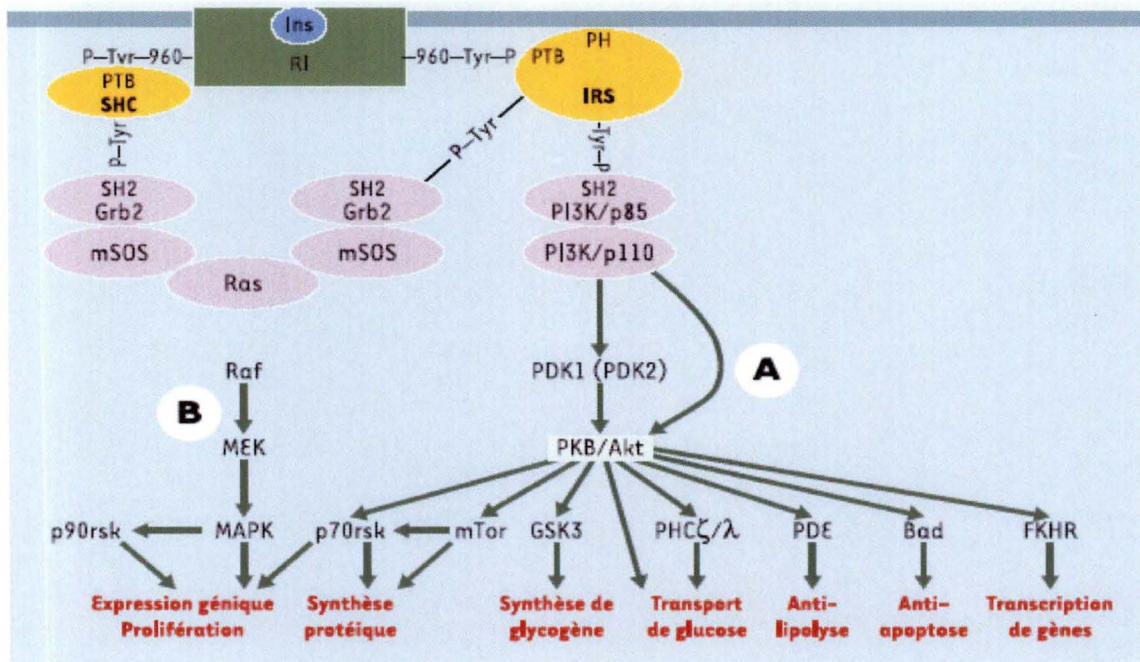


Figure 1.13. Schéma illustrant les principales voies de signalisation de l'insuline, la voie de la PI3K (A) et la voie des MAPK (B) et leurs actions sur le métabolisme. Le récepteur à l'insuline auto-phosphorylé sur des résidus tyrosines Tyr960 active par phosphorylation des protéines IRS et SHC qui recrutent alors différentes protéines et induisent des voies de signalisation différentes comme la voie de la PI3K essentielle dans la survie cellulaire, le transport du glucose, la synthèse du glycogène et la synthèse des protéines, et la voie des MAPK essentielle dans la réponse mitogénique. La voie de la PI3K peut également réguler la réponse mitogénique par la kinase p70rsk (Capeau, 2003).

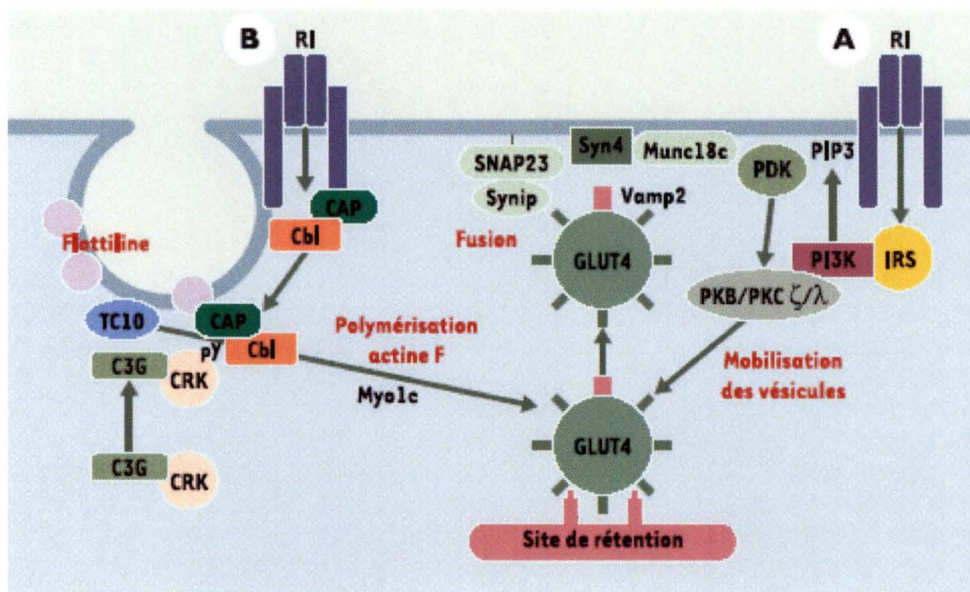


Figure 1.14. Schéma illustrant la translocation du transporteur du glucose GLUT4 dans la membrane plasmique de cellules musculaires et adipeuses en réponse à l'insuline. (A) Le récepteur à l'insuline activé recrute la sous unité régulatrice p85 de la PI3K via la liaison transitoire à une protéine substrat (IRS). L'activation de la voie PI3K permet de lever le signal de rétention qui maintenait les vésicules contenant les transporteurs GLUT4 au niveau du réseau golgien. (B) La polymérisation des microfilaments d'actine par la voie CAP (c-Cbl associated protein)/Cbl permet la translocation en membrane plasmique des vésicules, correctement ciblées grâce au système de reconnaissance v-SNARE t-SNARE (vesicle or target SNAP (soluble NSF attachment protein) receptor) (Capeau, 2003).



l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par un mécanisme dépendant d'une  $\text{K}^+$ -ATPase. Un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux VDACC (*voltage-dependent calcium channel*) provoque alors l'exocytose de vésicules d'insuline dans le milieu extracellulaire (Wollheim 2000).

L'insuline est une hormone anabolique majeure impliquée dans la mise en réserve et l'utilisation de substrats énergétiques lipidiques ou glucidiques dans les synthèses protéique et d'ADN, la croissance, le développement et le contrôle de l'apoptose (figure 1.12) (Wollheim 2000).

Le récepteur à l'insuline appartient à une famille de récepteurs à des facteurs de croissance possédant une activité tyrosine kinase intrinsèque. C'est un hétérotétramère, composé de deux chaînes  $\alpha$  extracellulaires possédant un domaine de liaison à l'insuline et reliées par des ponts disulfures à deux chaînes  $\beta$  transmembranaires dont le domaine cytosolique possède une activité tyrosine kinase ((Virkamaki, Ueki et al. 1999). La liaison de l'insuline à son récepteur déclenche l'activité tyrosine kinase de l'une des deux sous unités  $\beta$ , puis une autophosphorylation du récepteur sur des résidus tyrosine spécifiques conduisant à son activation (figure 1.13). Le récepteur activé recrute de manière transitoire des protéines de type IRS (*insulin receptor substrate*) ou des protéines adaptatrices de type SHC (*src homologous and collagen protein*) qui possèdent un domaine PTB (*phosphotyrosin binding domain*). Ces protéines sont elles-mêmes transphosphorylées par le récepteur à l'insuline, créant ainsi des sites de liaison pour des protéines à domaine SH2. Les protéines à domaine SH2, comme la sous-unité régulatrice (p85) de la PI3K (*phosphatidyl-inositol 3 kinase*) et les protéines Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), sont des adaptateurs ne possédant pas d'activité enzymatique intrinsèque qui conduisent à l'activation respectivement de deux voies principales de signalisation de l'insuline : la voie de la PI3K et la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Capeau 2003).

La PI3K activée phosphoryle les phosphoinositides membranaires en position 3, créant ainsi des sites de reconnaissance pour d'autres kinases cellulaires comme la PKB/Akt (*protein kinase B*) ou la PDK1/2 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1/2*) (figure 1.13). La PKB/Akt, activée par phosphorylation, active ou inhibe à son tour des protéines en aval responsables des effets métaboliques de l'hormone. Parmi ces actions, citons comme l'inhibition de la GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) qui favorise la synthèse du glycogène, ou encore l'inhibition de Bad, un facteur pro-apoptotique (Capeau 2003).

Un effet métabolique de l'insuline particulièrement bien étudié dans les adipocytes et les cellules musculaires et qui illustre la complexité des voies de signalisation activées par l'insuline est l'incorporation du glucose suite à la translocation, en membrane plasmique, de vésicules du réseau transgolgien (TGN) contenant GLUT4, un transporteur du glucose. Ce processus met en jeu plusieurs voies de signalisation dont celles de la PI3K et de la Cbl. Ces vésicules se déplacent vers la membrane plasmique grâce à des microfilaments d'actine F, polymérisés en réponse à l'insuline (figure 1.14) (Capeau 2003).

La liaison de l'insuline à son récepteur initie également l'activation de la voie des MAPK par deux mécanismes différents (figure 1.13). La liaison de l'adaptateur Grb2 sur des phosphotyrosines spécifiques permet d'activer le facteur d'échange nucléotidique SOS (*son of sevenless*) qui active Ras, une petite protéine G, dans la membrane plasmique en stimulant l'échange du GDP contre le GTP. Il s'ensuit l'activation de la cascade de phosphorylation Raf-MEK (une MAPK kinase)-ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*). Les kinases ERK1/2 sont transloquées dans le noyau et activent des facteurs de transcription (c-fos, c-myc, ...) impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. La voie des MAPK peut également être activée par les protéines adaptatrices de type SHC recrutées par le récepteur à l'insuline phosphorylé sur la tyrosine 960. Ces protéines SHC sont également reconnues par Grb2/SOS et activent la voie Ras (Capeau 2003).



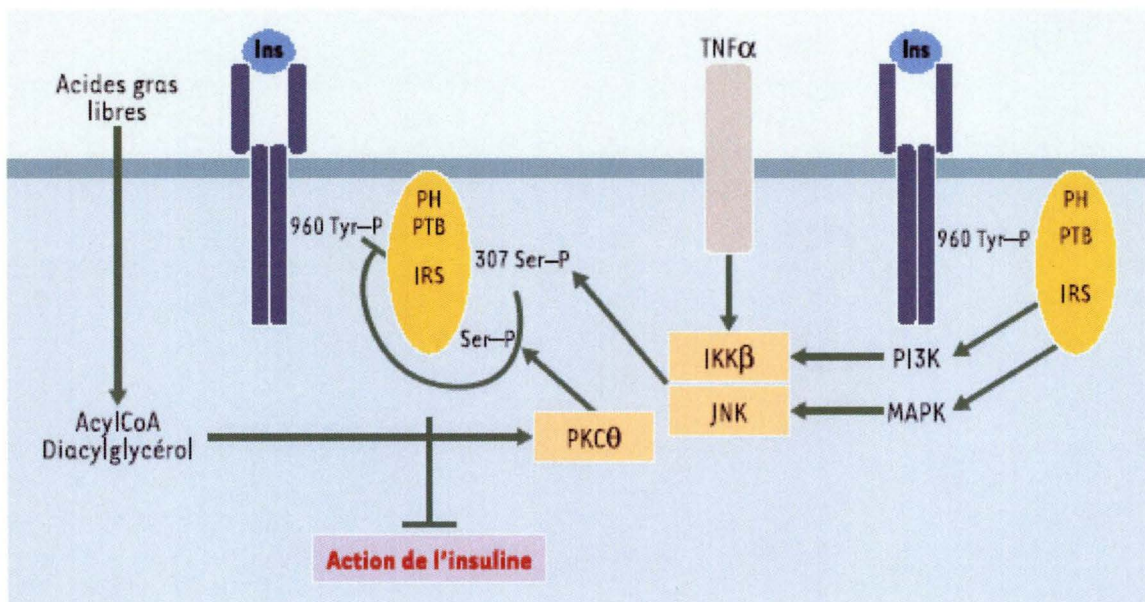


Figure 1.15. Schéma illustrant l'inhibition de la voie de signalisation activée par l'insuline suite à la phosphorylation des protéines IRS sur des résidus Ser/Thr initiée par le TNF- $\alpha$  (tumor-necrosis factor  $\alpha$ ) et des acides gras libres. Le TNF- $\alpha$  induit l'activation des kinases IKK $\beta$  (inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B kinase), et JNK (jun-kinase :c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase), deux enzymes capables de phosphoryler les IRS sur des résidus Ser/Thr. Par exemple, la JNK phosphoryle la sérine 307 de l'IRS-1, empêchant son interaction avec la tyrosine 960 phosphorylée du récepteur à l'insuline et induisant un état de résistance à l'hormone. Une augmentation de la concentration des acides gras libres dans la cellule résultant par exemple d'une lipolyse accrue dans le tissu adipeux insulino-résistant peut conduire à l'accumulation d'acyl-CoA et de diacylglycérol dans les muscles et le foie, entraînant une activation de la PKC $\theta$  et une phosphorylation inhibitrice des résidus Ser/Thr de l'IRS-1 (Capeau, 2003).

Nous sommes maintenant en mesure de comprendre la mécanistique moléculaire sous-jacente à de nombreuses formes de résistance à l'insuline.

#### 1.1.4.3.2 La résistance à l'insuline

Les causes du diabète sont multiples et variées (monogénique, auto-immune, ...). On peut classer les types de diabète en deux grands groupes : le diabète de type I et le diabète de type II.

Le diabète de type I ou diabète insulino-dépendant, est caractérisé par une hyperglycémie chronique due à un déficit primaire et généralement absolu de la synthèse d'insuline résultant d'une destruction auto-immune des cellules  $\beta$  (Portha 2003).

Le diabète de type II ou diabète insulino-résistant, est caractérisé par le développement d'une résistance des tissus périphériques (essentiellement squelettiques et adipeux) à l'action de l'insuline et entraîne, à long terme, un déficit de la production d'insuline résultant d'un épuisement des cellules  $\beta$  à tenter de maintenir la normoglycémie, en dépit de l'insulinorésistance, par une hyperinsulinémie (production et sécrétion chronique d'insuline plus élevées) (Portha 2003).

Au niveau moléculaire, la résistance à l'insuline peut résulter de phosphorylations du récepteur à l'insuline ou des IRS sur des résidus sérine ou thréonine, mettant ainsi fin respectivement à l'activation physiologique du récepteur ou à la transduction du signal induite par l'insuline. De nombreux signaux sont capables d'induire ces phosphorylations qui inhibent l'interaction entre l'IRS et la Tyr960 phosphorylée du récepteur à l'insuline. Citons, à titre d'exemple, une cytokine inflammatoire comme le TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) et les acides gras libres, deux composants synthétisés et libérés par le tissu adipeux (figure 1.15) (Capeau 2003).

#### 1.1.4.3.3 Diabètes et dysfonctionnement mitochondrial

Dans la population diabétique, environ 10 % des individus développent un diabète suite à une mutation dans le génome mitochondrial. Actuellement, 40 mutations ou délétions dans l'ADNmt ont été identifiées comme étant la cause d'un diabète. Par exemple, en plus de leurs effets systémiques, des mutations dans le génome mitochondrial des cellules  $\beta$  du pancréas diminuent la sécrétion d'insuline et induisent de ce fait un diabète de type I (Lamson and Plaza 2002).

Il a également été montré que le diabète de type II est une maladie métabolique chronique très répandue, en particulier chez les individus obèses et les personnes âgées. La résistance à l'insuline qui s'installe dans ces conditions conduit à une réduction du métabolisme du glucose dans les tissus musculaires (qui représentent environ 25 % de la masse corporelle). Ces modifications métaboliques s'accompagnent souvent, chez les personnes âgées, d'une augmentation de l'accumulation des graisses dans les muscles et le foie et d'une réduction de 40 % des phosphorylations oxydatives dans les mitochondries (Petersen, Befroy et al. 2003). Ces auteurs suggèrent que la diminution de l'activité mitochondriale au cours du vieillissement contribuerait à l'apparition de la résistance à l'insuline chez les diabétiques de type II parmi les personnes âgées.

#### 1.1.4.3.4 Diabète insulino-résistant et obésité

Environ 80 % des individus souffrant du diabète de type II sont obèses. L'obésité, considérée par certains auteurs comme une pathologie, est un problème de santé publique dont l'incidence ne cesse de croître dans les pays industrialisés. Elle est définie par un indice de masse corporelle (BMI, *body mass index* càd masse /taille en cm) supérieur ou égal à 30 et est caractérisée par une hypertrophie et/ou une hyperplasie des cellules adipeuses (Nadler, Stoehr et al. 2000) que nous allons développer dans la suite de cette introduction.



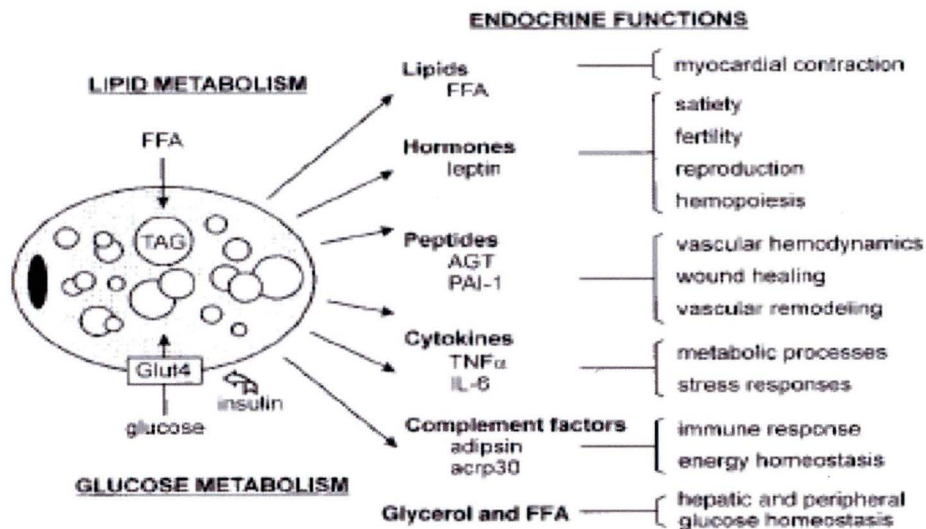


Figure 1.16. Schéma qui illustre les fonctions endocrines des adipocytes. Les adipocytes jouent un rôle majeur dans le métabolisme des lipides par leur fonction de stockage des acides gras sous la forme de triglycérides. Ils sont également le siège d'un métabolisme du glucose suite à l'expression et à la translocation d'un transporteur du glucose, GLUT4, régulée par l'insuline. Les adipocytes sécrètent également des lipides, des hormones, des peptides, des cytokines, des facteurs du complément, des acides gras libres et du glycérol. FFA : free fatty acid ; AGT : angiotensinogen ; PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1 ; TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$  ; IL-6 : interleukine-6 ; acrp30 : adipocyte complement-related protein) (Morrison and Farmer, 2000).

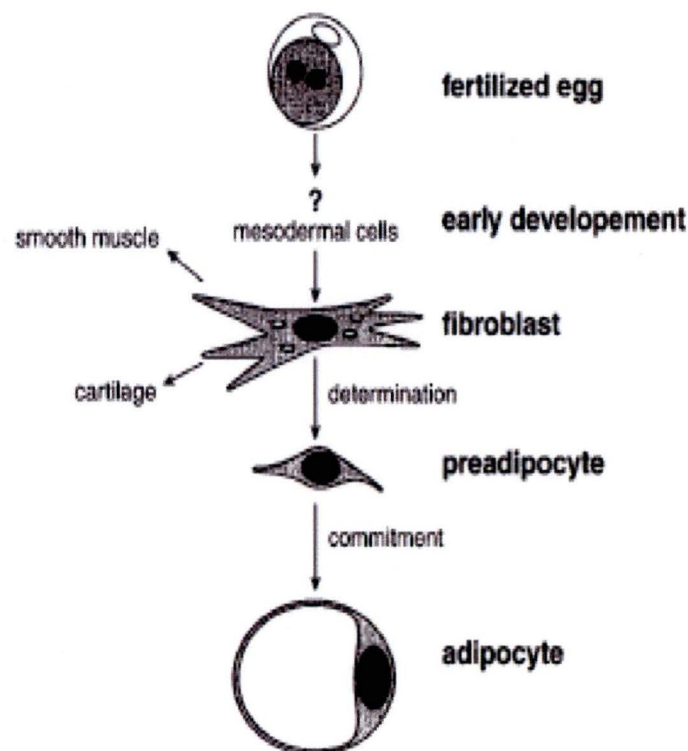


Figure 1.17. Modèle du développement morphologique d'un adipocyte blanc à partir d'un œuf fécondé. Au cours de l'étape de « détermination », un fibroblaste pluripotent peut se différencier en myocyte, ostéocyte ou pré-adipocyte. L'étape de « commitment » recouvre l'ensemble des événements séquentiels initiés par les conditions pro-adipogènes (Ntambi and Kim, 2000).



## 1.2 L'adipogenèse ou différenciation adipocytaire

### 1.2.1 Les tissus adipeux

On distingue deux grands types de tissus adipeux : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc.

La graisse brune, particulièrement abondante chez le fœtus et les mammifères hibernant, disparaît au cours du développement chez de nombreuses espèces dont l'homme. Elle est caractérisée par des adipocytes riches en mitochondries, dont la fonction essentielle est la thermogenèse. La protéine UCP-1 (*uncoupling protein-1*), marqueur moléculaire essentiel des adipocytes bruns, est présente dans la membrane mitochondriale interne et découple le potentiel électrochimique créé par les phosphorylations oxydatives, libérant ainsi l'énergie sous forme de chaleur (Rosen and Spiegelman 2000).

Le tissu adipeux blanc peut être viscéral (péritréal, péristomacal et mésentérique), intra- et intermusculaire, sous cutané ou localisé dans la moelle osseuse. A l'image des cellules endothéliales tapissant les différentes structures vasculaires, les adipocytes présentent des différences morphologiques et métaboliques en fonction de leur localisation. Les adipocytes blancs sont caractérisés, *in vivo*, par la présence d'une vésicule lipidique cytosolique unique, contrairement à leurs homologues bruns qui accumulent de multiples petites vésicules de triglycérides. Les cellules adipeuses accumulent près de 95 % des triglycérides stockés et représentent de 15 à 20 % de la masse corporelle. Longtemps perçu comme n'ayant qu'une fonction passive de stockage de triglycérides, le tissu adipeux blanc est actuellement considéré comme une structure endocrine qui synthétise et libère des hormones et des cytokines (appelées adipokines) suite à des stimuli extracellulaires spécifiques ou à des modifications métaboliques de l'organisme (figure 1.16). Ces produits de sécrétion et leurs effets seront abordés au paragraphe 3.2.3.1.

Le processus de différenciation cellulaire des pré-adipocytes en adipocytes blancs, ou adipogenèse, est nécessaire au renouvellement cellulaire et au maintien des fonctions de sécrétion et de stockage du tissu adipeux.

### 1.2.2 La différenciation cellulaire des pré-adipocytes en adipocytes blancs

Chez l'homme, le tissu adipeux apparaît tardivement au cours du développement embryonnaire, la différenciation adipocytaire se déroulant principalement peu de temps après la naissance (Ntambi and Young-Cheul 2000).

#### 1.2.2.1 Caractérisation morphologique des pré-adipocytes 3T3-L1 et des adipocytes blancs

Les adipoblastes proviennent de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes (tissu mésodermique) qui sont également capables de se différencier en chondroblastes et en myoblastes (figure 1.17) (McDougald and Lane, 1995). Les adipoblastes, à caractéristiques fibroblastiques, se différencient en pré-adipocytes unipotents par un mécanisme non connu et sont finalement différenciés en adipocytes lors d'une stimulation adéquate (Ntambi and Young-Cheul 2000).

L'adipocyte blanc mature est caractérisé *in vivo* par une morphologie arrondie, une hypertrophie et l'accumulation d'une vésicule (*in vivo*) ou plusieurs vésicules (*in vitro*) de triglycérides dans le cytosol. Ces vésicules sont des structures sphériques composées d'un noyau de lipides neutres, ou triglycérides, recouverts d'une monocouche de phospholipides, de cholestérol libre et de protéines comme la périlipine A, une protéine majoritaire du manteau des vésicules.

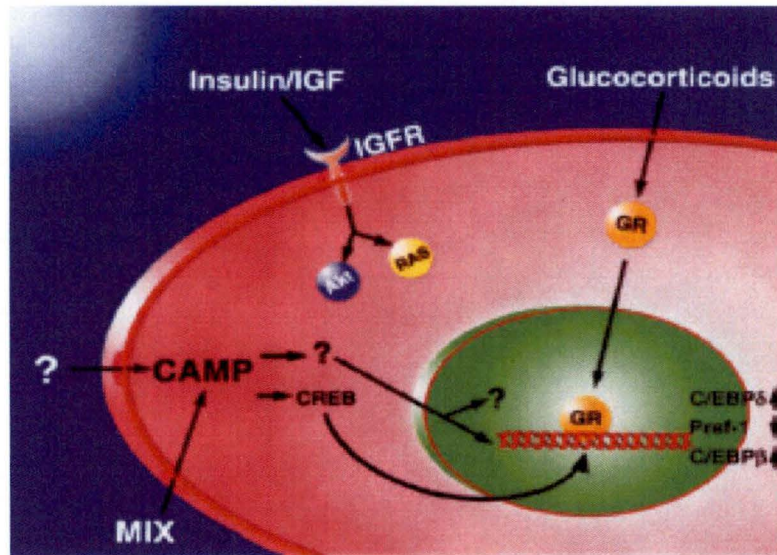


Figure 1.18. La différenciation adipocytaire est stimulée *in vitro* par un cocktail pro-adipogène composé d'insuline, d'un analogue structural de l'AMPc comme le db-AMPc, de MIX (Méthyl-3-IsobutylXanthine) et d'un glucocorticoïde synthétique comme la dexaméthasone (Rosen and Spiegelman, 2000).

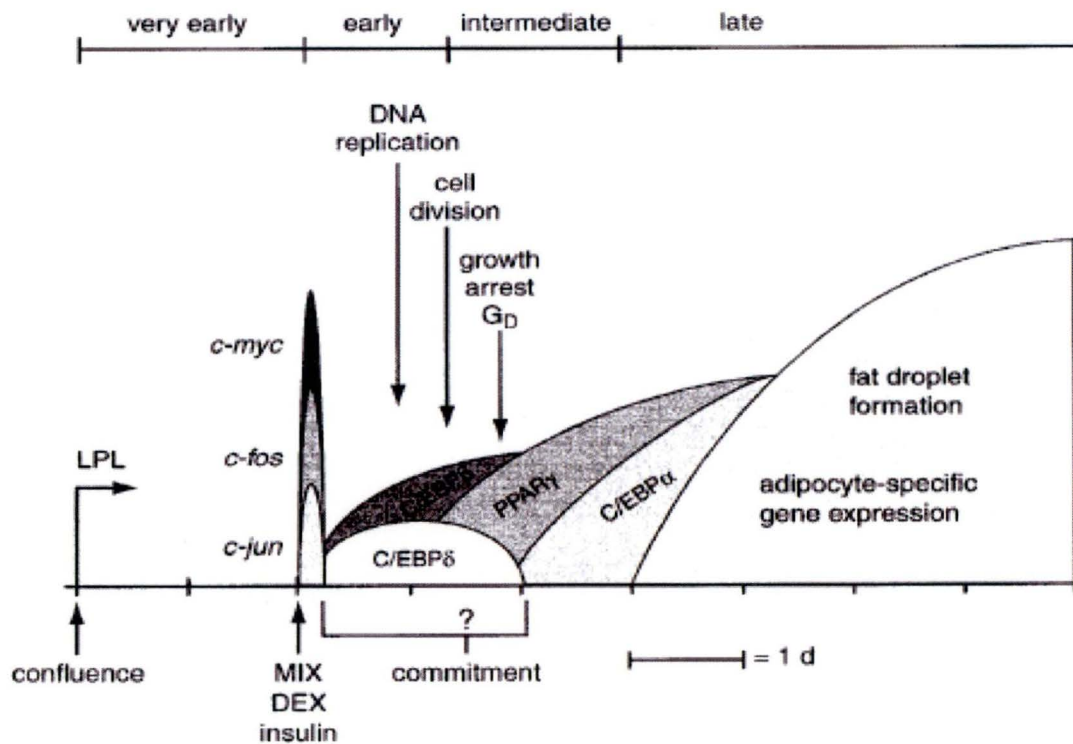


Figure 1.19. Schéma illustrant les étapes de la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1. Les événements principaux de l'adipogenèse sont présentés chronologiquement. LPL : lipoprotein lipase ; C/EBP : CCAAT/enhancer binding protein ; PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor ; MIX : methylisobutylxanthine ; DEX : dexamethasone (Ntambi and Kim, 2000).



### 1.2.2.2 Caractérisation moléculaire de l'adipogenèse

Le premier modèle de différenciation adipocytaire du type cellulaire 3T3-L1 a été établi par Student et ses collaborateurs qui montrent que la différenciation adipocytaire est régulée par l'activation séquentielle et ordonnée de plusieurs facteurs de transcription dont l'expression et/ou l'activité augmentent après induction de l'adipogenèse par un cocktail pro-adipogène (Student, Hsu et al. 1980).

#### 1.2.2.2.1 Les inducteurs de l'adipogenèse

Le cocktail hormonal utilisé pour induire la différenciation adipocytaire peut être composé d'insuline, d'un analogue structural de l'AMPc, comme le db-AMPc (*dibutyl-adenosine monophosphate cyclic*), de MIX (*1-Méthyl-3-IsobutylXanthine*), de forskoline et d'un glucocorticoïde synthétique comme la dexaméthasone (figure 1.18).

Les pré-adipocytes possèdent de nombreux récepteurs à l'IGF-1 (*insulin-like growth factor* de type 1) et peu de récepteurs à l'insuline (MacDougald and Lane, 1995). Le récepteur à l'IGF-1 appartient à la même famille de récepteurs que le récepteur à l'insuline. Son substrat, l'IGF-1 peut donc se lier au récepteur à l'insuline, et inversement, une concentration en insuline très élevée (comme celle utilisée pour la différenciation : de l'ordre de 800 nM) et non physiologique peut activer le récepteur à l'IGF-1. L'insuline présente dans le cocktail hormonal se lie donc majoritairement aux récepteurs à l'IGF-1, activant également les voies de la PI3K et des MAPK (MacDougald and Lane, 1995 ; (Klemm, Leitner et al. 2001)).

La production d'AMPc (*adenosine monophosphate cyclic*) est initiée classiquement par la liaison d'hormones spécifiques (par exemple le glucagon) à leur récepteur, stimulant l'activité de l'adénylate cyclase, une enzyme qui catalyse la conversion de l'ATP en AMPc. L'AMPc active de manière allostérique la PKA (*protein kinase A*), qui active CREB par phosphorylation sur la Ser<sup>133</sup> et ce très précocement au cours de l'adipogenèse (paragraphe 2.1.2.1).

Le db-AMPc, le MIX et la forskoline sont des activateurs mimétiques de cette voie. Le db-AMPc augmente la concentration intracellulaire en AMPc, le MIX inhibe une phosphodiesterase activé sur l'AMPc, et la forskoline active directement l'adénylate cyclase de manière allostérique.

La dexaméthasone est un agoniste synthétique qui active un récepteur cytosolique aux glucocorticoïdes. Le récepteur activé est transloqué dans le noyau et induit indirectement l'expression de certains gènes cibles, comme C/EBP $\beta$  (*CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$* ) suite à l'inhibition de l'expression de pref-1, un inhibiteur de l'adipogenèse qui réprime l'expression de C/EBP $\beta$ , un facteur de transcription essentiel à l'adipogenèse ((Smas, Chen et al. 1999) ; (Rosen and Spiegelman 2000)).

#### 1.2.2.2.2 L'adipogenèse des 3T3-L1 au niveau moléculaire

Lorsque les pré-adipocytes sont confluents, le contact cellule-cellule arrête les divisions cellulaires (inhibition de contact) et induit l'expression de marqueurs précoces de la différenciation adipocytaire tels que la lipoprotéine lipase (LPL), le collagène de type VI $\alpha$ 2 et FAAR, un récepteur nucléaire activé par les acides gras (*fatty acid-activated receptor*) (figure 1.19) (MacDougald and Lane, 1995).

Une heure après l'addition du cocktail adipogénique, les cellules 3T3-L1 expriment les protéines c-fos, c-jun, c-myc, des acteurs mitogéniques impliqués dans la reprise du cycle cellulaire. Un ou deux cycles mitotiques post-confluence précèdent ainsi le processus de différenciation adipocytaire proprement dit (phase d'expansion mitotique clonale) (figure 1.19).



Suite à cette phase de divisions, la différenciation adipocytaire est alors contrôlée par l'expression et/ou l'activation séquentielle de facteurs de transcription, qui régulent l'expression des gènes impliqués dans les différentes étapes de l'adipogenèse (figure 1.19).

Les facteurs C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  sont exprimés rapidement et de manière transitoire en réponse au cocktail hormonal. Les protéines C/EBPs appartiennent à une grande famille de facteurs de transcription qui possèdent un domaine *leucine zipper* C-terminal permettant la dimérisation des facteurs, et un domaine basique qui lie l'ADN (Hamm, Park et al. 2001). Les facteurs C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  augmentent l'expression de C/EBP $\alpha$ , qui à son tour, initie la transcription de gènes tels que GLUT4 et SCD-1. C/EBP $\alpha$  possède en outre une activité antimitotique. Son expression induit l'arrêt du cycle cellulaire après la phase d'expansion mitotique clonale (Darlington, Ross et al. 1998). Les activités de transactivation et antimitotique de C/EBP $\alpha$  contribuent au maintien de la différenciation terminale des adipocytes 3T3-L1 (MacDougald and Lane, 1995 ; (Darlington, Ross et al. 1998)).

L'activation séquentielle des facteurs C/EBPs est critique dans la différenciation adipocytaire. En effet, exprimé prématurément, C/EBP $\alpha$ , par son activité antimitotique, pourrait inhiber la phase d'expansion mitotique clonale qui précède l'adipogenèse. Son expression est donc réprimée, indirectement, par CHOP 10, une protéine de la famille C/EBP qui exerce un effet dominant négatif naturel sur C/EBP $\beta$ . Chop 10 est exprimé lors de l'arrêt de prolifération des pré-adipocytes et interagit de manière transitoire avec C/EBP $\beta$ , formant un hétérodimère inactif. Il retarde ainsi l'acquisition de l'activité de liaison à l'ADN de C/EBP $\beta$ , et donc la transactivation de C/EBP $\alpha$  jusqu'à la fin de la phase d'expansion mitotique clonale (Tang and Lane 2000).

PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$ , seuls ou en synergie, induisent la transcription de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans la création et le maintien du phénotype adipocytaire (Gregoire, Smas et al. 1998). Dans la superfamille des récepteurs nucléaires, les facteurs de transcription PPAR $\alpha$ , essentiellement exprimé dans le foie, PPAR $\gamma$ , exprimé majoritairement dans les pré-adipocytes, et PPAR $\beta$ , un facteur ubiquiste, forment une sous-famille de senseurs aux lipides (Evans, Barish et al. 2004). La protéine PPAR $\gamma$ , présente sous la forme de trois isotypes ( $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3) résultant de l'utilisation de sites d'initiation de la transcription différents d'un gène unique, est un facteur de transcription nécessaire et suffisant à la différenciation adipocytaire et au maintien du phénotype adipocytaire. Son activité transcriptionnelle passe par la formation d'un hétérodimère obligatoire avec RXR $\alpha$  (*retinoic acid receptor*  $\alpha$ ). De plus, l'activité du complexe PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  est fortement augmentée par la liaison de ligands de PPAR $\gamma$  naturels tels que les acides linoléique, linolénique et arachidonique ou des agonistes synthétiques comme les thiazolidinediones (TZDs) utilisés à des fins thérapeutiques dans le diabète de type II (Hamm, Park et al. 2001). PPAR $\beta$  est un régulateur-clé dans les processus de catabolisme des acides gras et d'homéostasie énergétique. Le rôle de PPAR $\beta$  dans l'utilisation des acides gras s'oppose donc à celui de PPAR $\gamma$  dans le stockage des graisses (Evans, Barish et al. 2004).

De plus, une régulation positive précoce de l'adipogenèse a été démontrée pour le facteur ADD1/SREBP-1c (*Adipocyte Determination- and Differentiation-dependent factor 1 / Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c*). Les protéines SREBPs appartiennent à une famille de facteurs de transcription de type *basic helix-loop-helix leucine zipper* (bHLH-Zip). Ces facteurs sont synthétisés en tant que précurseurs inactifs et ancrés dans le feuillet externe de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux (RER). Lors d'une déplétion cellulaire en cholestérol, ces facteurs de transcription inactifs, complexés à la protéine SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*), migrent vers le complexe de Golgi où ils sont séquentiellement clivés par deux protéases, S1P (*site-1 protease*) et S2P (*site-2 protease*). Le domaine amino-terminal ainsi libéré migre vers le noyau et active l'expression de gènes cibles. Le facteur





SREBP1 existe sous deux isoformes, SREBP1-a et SREBP1-c (une version tronquée d'une partie de l'exon 1), qui dérivent d'un même gène. La protéine SREBP1-c régule l'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans la synthèse du cholestérol, des triglycérides et des acides gras, tels que la FAS (*fatty acid synthase*) et l'ACC (*acetyl-CoA carboxylase*) qui participent à la lipogenèse. SREBP1-c est également impliquée dans la production de ligands endogènes de PPAR $\gamma$  tels que les acides gras néosynthétisés (Rosen *et al.*, 2000). Ce facteur participe donc indirectement à l'activation de PPAR $\gamma$ .

Les travaux de Reusch *et al.* ont montré récemment qu'un autre facteur de transcription, CREB, activé très tôt au cours de l'adipogenèse, semble nécessaire et suffisant pour induire la différenciation adipocytaire des 3T3-L1 (paragraphe 2.2.1) (Reusch, Colton *et al.* 2000).

En raison de l'importance suspectée du facteur de transcription CREB dans la différenciation adipocytaire (Reusch, Colton *et al.* 2000) et de l'intérêt porté au laboratoire à ce facteur de transcription dans le cadre du dysfonctionnement mitochondrial, nous allons maintenant présenter ce facteur de transcription plus en détails.

## 2 Le facteur de transcription CREB

### 2.1 Structure et activation de la protéine CREB

#### 2.1.1 La structure de CREB

La protéine CREB est un facteur de transcription de 43 kDa appartenant à la famille des « *leucine zipper* » au même titre que les facteurs CREM (*cAMP-responsive element modulator*) et ATF-1 (*activating transcription factor-1*). Ces trois protéines ont été identifiées et caractérisées pour la première fois lors d'études menées sur la régulation de la biosynthèse d'hormones peptiques par un messager secondaire, l'AMPc. L'AMPc, produit par l'adénylate cyclase, stimule l'expression de gènes cibles qui comporte un élément de réponse conservé dans leur promoteur, la séquence consensus palindromique CRE (*cAMP-responsive element*), -TGACGTCA-, localisée environ 100 nucléotides en amont de la boîte TATA dans la partie proximale du site d'initiation de la transcription ((Conkright, Canettieri *et al.* 2003); (Montminy 1997)). Les trois facteurs, CREB, ATF-1 et CREM, se lient à l'élément de réponse CRE sous une forme homo ou hétérodimérique.

La protéine CREB (figure 1.20) est constituée d'un domaine de liaison à l'ADN basique (riche en résidus lysine et arginine) à son extrémité carboxy-terminale, d'un domaine *leucine zipper* qui assure sa dimérisation, de deux domaines riches en glutamine, Q1 et Q2/CAD (*constitutive active domain*) et d'un domaine KID (*kinase inducible domain*) (Lonze and Ginty 2002).

Les trois gènes *Creb*, *Crem* et *Atf-1*, conservés au cours de l'évolution, codent pour des protéines qui partagent un haut degré d'homologie de séquence particulièrement dans le domaine contenant les résidus phosphorylables (figure 1.21) et chacun code de nombreux isoformes (De Cesare, Fimia *et al.* 1999).

#### 2.1.2 Les voies de signalisation conduisant à l'activation ou à l'inhibition de l'action transactivatrice de CREB

Le facteur de transcription CREB est activé en réponse à de nombreux stimuli, tels que des hormones peptidiques et des facteurs de croissance. Ces stimuli activent des cascades de kinases qui aboutissent à la phosphorylation de CREB sur la Ser133 (figure 1.22). Les voies



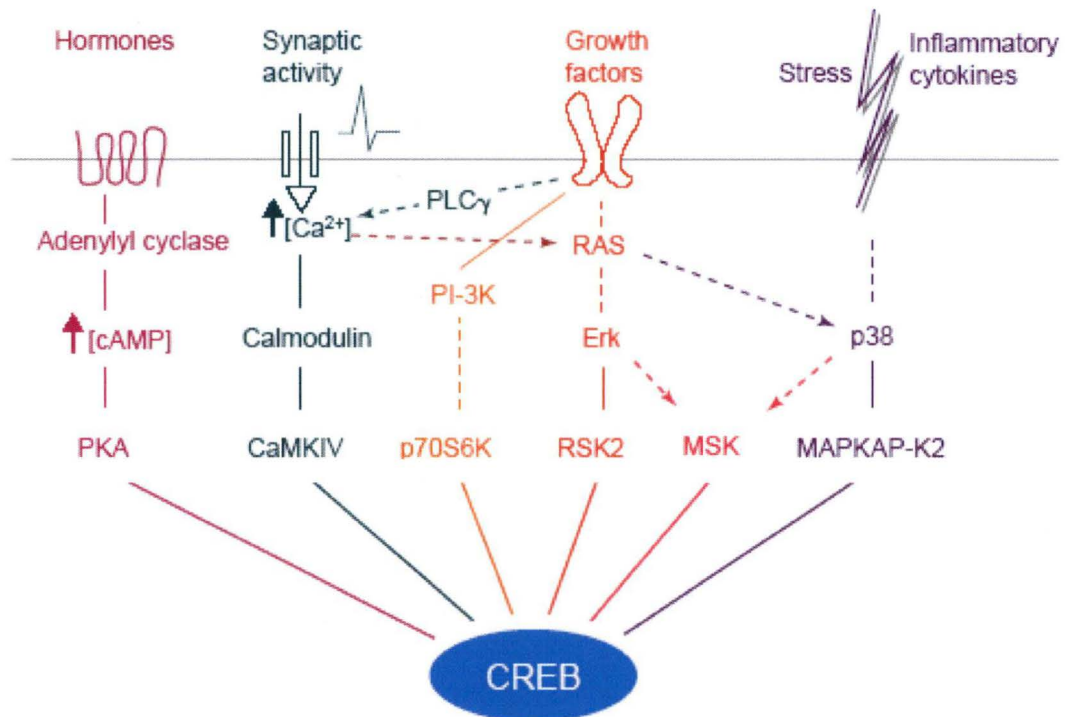


Figure 1.22. Principales voies de transduction du signal qui conduisent à l'activation du facteur de transcription CREB. CREB peut être activé par différents stimuli : une dépolarisation, un facteur de croissance, une cytokine inflammatoire. cAMP : cyclic Adenosine MonoPhosphate ; PKA : Protein Kinase A ; CaMKIV : Calmodulin-dependent Kinase IV ; PLCγ : Phospholipase Cγ ; PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase ; p706SK : p70 6S Kinase ; Erk : Extracellular-Regulated Kinase ; RSK2 : Ribosomal S6 Kinase ; MSK : Mitogen-and Stress-activated Kinase ; MAPKAP-K2 : MAP-Kinase-activated Protein-Kinase 2. Les flèches en pointillés représentent une voie nécessitant d'autres facteurs non mentionnés (De Cesare et al., 1999).

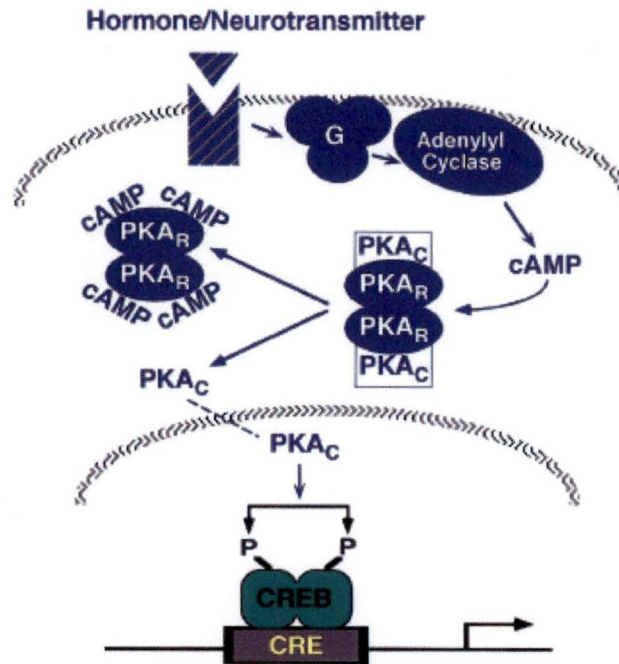


Figure 1.23. La voie PKA est initiée par l'activation de l'adénylate cyclase induite par la liaison d'une hormone à son récepteur couplé aux protéines G. L'adénylate cyclase catalyse la production d'AMPc et celui-ci induit l'activation de la PKA en se liant aux sous-unités régulatrices. En effet, en absence d'AMPc, la PKA est constituée de deux sous-unités régulatrices ( $PKA_R$ ), liées à deux sous-unités catalytiques ( $PKA_C$ ) inactives. Lorsque la concentration en AMPc augmente, quatre molécules d'AMPc viennent se lier aux dimères de  $PKA_R$ , libérant ainsi les sous-unités  $PKA_C$  actives. Celles-ci sont transloquées dans le noyau où elles phosphorylent la protéine CREB sur la  $Ser^{133}$ , qui est préalablement dimérisée et liée à sa séquence consensus dans le promoteur des gènes cibles (Shaywitz and Greenberg, 1999).

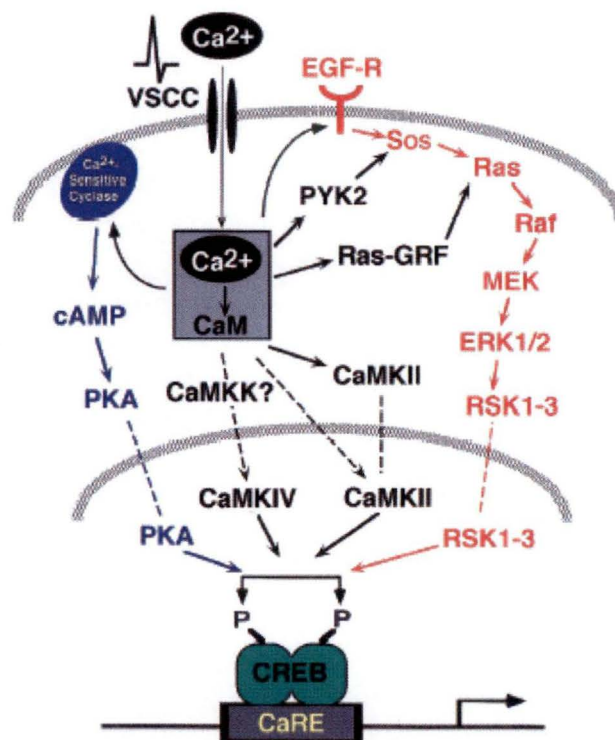


Figure 1.24. De multiples voies de transduction du signal contribuent à l'activation de CREB en réponse à un influx de  $Ca^{2+}$  qui peut résulter d'une dépolarisation de la membrane plasmique dans les cellules neuronales ou de la liaison de facteurs de croissance comme l'EGF à son récepteur. Dans la cellule, le complexe  $Ca^{2+}/CaM$  peut activer la voie de la PKA, des CaMK et des MAPK (Shaywitz and Greenberg, 1999).



de la PKA, des MAPKs et des protéines kinases dépendantes du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) (CaMK) sont les mieux caractérisées (Shaywitz and Greenberg 1999).

#### 2.1.2.1 La transduction du signal dépendante de l'AMPc

La voie médiée par l'AMPc et la PKA a été la première voie identifiée comme étant impliquée dans l'activation du facteur CREB (figure 1.23). La liaison d'hormones, comme le glucagon, à leur récepteur active des protéines G hétérotrimériques. Les sous-unités  $\alpha$  activent directement l'adénylate cyclase qui catalyse la production d'AMPc. L'AMPc est responsable de l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui est transloquée dans le noyau où elle phosphoryle la protéine CREB sur la Ser133 (Shaywitz and Greenberg 1999).

#### 2.1.2.2 La transduction du signal initiée par des facteurs de croissance et par l'insuline

La voie des MAPK (paragraphe 1.1.4.3.1) qui aboutit à l'activation du facteur CREB peut être initiée par la liaison de l'IGF-1 et de l'insuline (à des concentrations élevées) aux récepteurs à l'IGF-1, nombreux en membrane des pré-adipocytes.

La voie de la PI3K qui induit l'inhibition de la GSK3 (paragraphe 1.1.4.3.1) aboutit également à la modification de l'état de phosphorylation de CREB sur la Ser133 (Shaywitz and Greenberg 1999).

La PKC et la CKII (*casein kinase II*) sont également capables de phosphoryler CREB sur différents sites, dont la Ser133. La CKII peut également phosphoryler la Ser142 de CREB et aurait un effet négatif sur l'action transactivatrice de CREB (Shaywitz and Greenberg 1999).

#### 2.1.2.3 La transduction du signal dépendante du $\text{Ca}^{2+}$

De nombreuses voies de signalisation dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ , un messager secondaire pléiotrope, contribuent à l'activation de CREB. Par exemple, dans les cellules neuronales, l'activité électrique conduit à une dépolarisation de la membrane et à l'ouverture de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage (*voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels*, VSCCs), ce qui se traduit par une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et l'activation de nombreuses kinases dont certaines phosphorylent CREB sur la sérine 133 (figure 1.24).

Suite à son entrée dans la cellule, le  $\text{Ca}^{2+}$  se lie à la calmoduline (CaM) et le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  peut alors activer la voie de la PKA en stimulant directement une isoforme de l'adénylate cyclase dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  (Shaywitz and Greenberg 1999).

Une autre voie d'activation de CREB dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  est celle des CaMKs qui est très bien caractérisée (figure 1.24). Le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  active directement la CaMKI, la CaMKII et la CaMKIV. Les CaMKI et IV activent CREB par phosphorylation sur la Ser133, alors que la CaMKII inhibe son activité par phosphorylation sur la Ser142. Le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  peut aussi activer la CaMKK (CaMK kinase), une kinase en amont, qui augmente encore l'activité de la CaMKI et de la CaMKIV, suite à la phosphorylation respectivement des résidus Thr177 et Thr196/Thr200 ((Shaywitz and Greenberg 1999); (Anderson, Means et al. 1998)).

Le calcium peut également activer la voie des MAPK par plusieurs mécanismes (figure 1.24) : l'influx de calcium peut induire l'activation du récepteur à l'EGF (*endothelial growth factor*) indépendamment de son ligand, et donc l'activation de la voie Sos-Raf-MEK, et le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  peut directement activer Ras, un intermédiaire de la voie Sos-Ras-ERK (Shaywitz and Greenberg 1999).

Finalement, l'activité de CREB est régulée par des phosphatases comme la calcineurine, également activée par le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , qui déphosphoryle la Ser133 de CREB *in vitro*. Les PP-1 (*protein phosphatase-1*) et PP-2 (*protein phosphatase-2*), deux

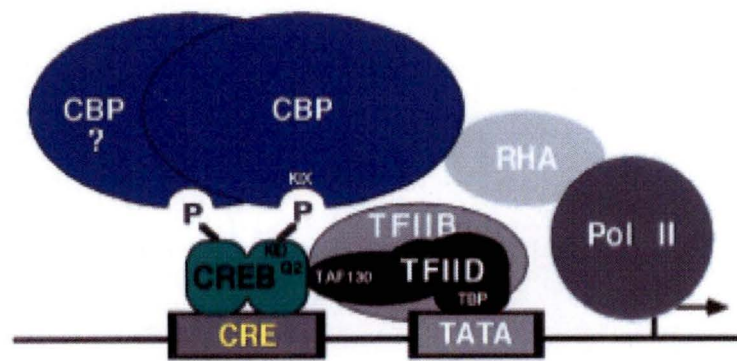


Figure 1.25. Le système CRE/CREB/CBP. Les multiples domaines de CREB contribuent à l'activation de l'expression des gènes cibles. Le domaine KID phosphorylé recrute le domaine KIX du co-activateur CBP et le domaine Q2 recrute la machinerie basale de transcription (Shaywitz and Greenberg, 1999).



phosphatases localisées dans le noyau, déphosphorylent également la Ser<sup>133</sup> de CREB *in vitro* et *in vivo* ((Wadzinski, Wheat et al. 1993) ; (Shaywitz and Greenberg 1999)).

### 2.1.3 L'action transactivatrice de CREB : le système CRE/CREB/CBP

Si la phosphorylation de la Ser133 est nécessaire à l'activité de CREB, son action transactivatrice et la spécificité de liaison de CREB à l'ADN pourraient encore être modulées par la phosphorylation de sites supplémentaires sur CREB ou sur des protéines co-activatrices associées à CREB, comme CBP (*CREB-binding protein*) (Shaywitz and Greenberg 1999).

Lorsque la Ser133 présente dans le domaine KID est phosphorylée, la conformation du domaine KID est modifiée et ce domaine devient une cible pour CBP (figure 1.25). Cette protéine nucléaire se lie à la forme phosphorylée de CREB par son domaine KIX, un domaine d'interaction avec le domaine KID de CREB. CBP est un pont moléculaire qui permet de recruter et de stabiliser la machinerie basale de transcription. En effet, CBP se lie de manière dimérique au dimère de CREB et interagit avec l'ARN hélicase A (RHA), elle-même associée à l'ARN polymérase II. De plus, CREB interagit avec le composant TAF 130 de TFIID et avec la protéine TFIIB par son domaine de transactivation Q2/CAD (Conkright, Canettieri et al. 2003).

## 2.2 Les fonctions du facteur de transcription CREB

### 2.2.1 La protéine CREB dans la différenciation adipocytaire

Le facteur CREB semble jouer un rôle crucial dans l'initiation de l'adipogenèse, notamment en induisant l'expression de C/EBP $\beta$  (Zhang, Klemm et al. 2004), de la PEPCK (*phosphoenolpyruvate carboxy kinase*), une enzyme importante de la néoglucogenèse, de la Fabp4/ap2 (*fatty acid binding protein 4/activated protein 2*), et de la FAS (Reusch, Colton et al. 2000). Toutes ces protéines sont des marqueurs classiquement utilisés pour caractériser la différenciation adipocytaire.

En outre, l'équipe de Reusch a montré que l'activité de CREB s'avère nécessaire et suffisante pour initier la différenciation adipocytaire (Reusch, Colton et al. 2000). En effet, la surexpression d'une forme constitutivement active de CREB (VP16-CREB) suffit à induire la différenciation des 3T3-L1, alors que la surexpression d'un dominant négatif K-CREB inhibe la différenciation des cellules induite par un cocktail adipogénique (Reusch, Colton et al. 2000).

### 2.2.2 La protéine CREB lors d'un dysfonctionnement mitochondrial

Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.1.4.2, CREB est également un facteur de transcription impliqué dans la « communication rétrograde » entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau. En effet, l'inhibition des phosphorylations oxydatives dans différents modèles cellulaires, tels que des cellules déplétées en ADNmt et des cellules HEK293 (*human embryonic kidney cells 293*) traitées avec des inhibiteurs métaboliques de la mitochondrie comme l'antimycine A est suffisante pour provoquer la phosphorylation de CREB sur la Ser133 par la CaMKIV. Suite à son activation, le facteur de transcription CREB semble alors impliqué dans l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par le dysfonctionnement mitochondrial (Arnould, Vankoningsloo et al. 2002).



### 3 Outils d'analyse de l'expression génique

Le développement des techniques d'analyse de l'expression de gènes permet actuellement de comparer des profils d'expression génique pour un grand nombre de candidats simultanément. Ces outils d'analyse peuvent être répartis en deux grandes classes distinctes : les outils qui permettent d'analyser l'expression du gène au niveau protéique (approches protéomiques) et les outils qui permettent une étude de l'abondance des transcrits (approches transcriptomiques).

#### 3.1 Présentation brève des deux approches protéomique et transcriptomique

L'approche protéomique (par des gels à une ou deux dimensions, associés à l'analyse en spectrométrie de masse) permet d'identifier des candidats, et renseigne sur l'abondance d'une protéine ou sur des modifications post-traductionnelles, mais ne fournit aucune information sur l'abondance des transcrits des gènes codant pour les protéines d'intérêt.

A titre d'exemples, nous pouvons citer deux approches protéomiques appliquées à la différenciation adipocytaire. L'équipe de Kratchmarova *et al.* a utilisé la technique de gel d'électrophorèse à une dimension combinée à une analyse en spectrométrie de masse pour purifier et identifier des facteurs sécrétés différenciellement exprimés par les pré-adipocytes et les adipocytes, comme l'Acrp30 et l'adipsine (Kratchmarova, Kalume *et al.* 2002). L'équipe de Welsh *et al.*, a utilisé les gels d'électrophorèse à deux dimensions pour analyser le profil d'expression génique au cours de l'adipogenèse et identifier des modifications de l'expression de près de 2000 protéines lors de la différenciation adipocytaire (Welsh, Griffiths *et al.* 2004).

Le microdamier à ADN est une technologie récente utilisée pour analyser le niveau d'expression de nombreux gènes simultanément (une centaine dans les microdamiers à faible densité à plusieurs milliers dans les microdamiers à haute densité), par une quantification relative de l'abondance des transcrits (Schena, Shalon *et al.* 1995). Une comparaison des profils globaux d'expression génique dans deux ou plusieurs conditions expérimentales est réalisable avec cette technologie. Cependant, cette technique présente quelques limitations. En effet, elle ne fournit aucune information sur la régulation de l'expression des gènes d'intérêts au niveau traductionnel ni sur des modifications au niveau post-traductionnelles souvent responsables de changements de l'activité et/ou de la localisation des protéines correspondantes. Elle ne renseigne d'ailleurs pas plus sur la modification de l'abondance des transcrits résultant d'une stabilisation de l'ARNm ou d'une régulation transcriptionnelle.

Nous pouvons citer, à titre d'exemples, deux applications d'un microdamier à haute densité à l'analyse de la différenciation adipocytaire. Une analyse comparative du profil d'expression génique des pré-adipocytes 3T3-L1 et des adipocytes a été réalisée par Guo et Liao à l'aide d'un microdamier à ADNc à haute densité permettant l'étude de l'expression de 18 376 gènes (Guo and Liao 2000). Ces auteurs ont ainsi montré que le processus de différenciation est le résultat d'un changement global de l'expression génique, parfois faible, et n'est pas explicable par une modification de l'expression d'un nombre restreint de gènes. Plus récemment, une seconde étude du profil d'expression génique au cours de l'adipogenèse des 3T3-L1 a été réalisée à l'aide d'un microdamier permettant l'analyse de l'expression de 12 488 gènes (Burton, Nagarajan *et al.* 2004). Ces auteurs ont incubé les pré-adipocytes en présence du cocktail pro-adipogène et d'un inhibiteur puissant de l'adipogenèse, la trichostatine A (un inhibiteur d'histone déacétylase). Les profils d'expression génique ont



	1	2	3	4	5	6	7
1	hyb ctl +	buffer	AAAT	Acrp 30	ADD1	Adipsin	ASP
2	Agt	IS#1 (CAB)	Agt	Actin	ATRIL	IS#3 (RCA)	$\beta$ 3-AR
3	Hyb Ctl -	CaMKII	CamKI V	cav-1 $\beta$	cav-2	C/EBP $\alpha$	C/EBP $\beta$
4	C/EBP $\delta$	Chop 10	CL	mtClic	Collagen	buffer	CPT-1 I
5	CPT-1m	IS#3 (RCA)	CPT-2	HSP 60	Cst C	IS#1 (CAB)	Cyclin D3
6	DHAPAT	eNOS	ER $\alpha$	CREB1	Fabp 4	FAS	Hyb Ctl -
7	GAPDH	Gata-2	Gata-3	GLUT4	GPAT	GPD cyto	GPD mit
8	Gsn	IS#2 (RBCL)	Gyk	p110 $\alpha$	HCNP	IS#5 (SIP)	Hp
9	Hyb Ctl -	HSD	HSL	HSP 84	HSP 86	IL-6	iNOS
10	Leptin	ARNr18S	I-PK	LPL1	MCAD	MMP2	NFAT C2
11	NFATC4	IS#5 (SIP)	p18	Stat 6	PAI 1	IS#2 (RBCL)	PEDF
12	PEPCK 1	Plin A	PPAR $\delta$	PPAR $\gamma$	Pref 1	RAB3D	Hyb Ctl -
13	Renin	IS#4 (RBCS)	Resisti n	RXR $\alpha$	RXR $\gamma$	SCD-1	SCD-2
14	Hyb Ctl -	SDF-1	SDF-2	TBP	Smad 3	IS#6 (TAPG)	SPAR C
15	Srebp-1	IS#6 (TAPG)	TF	TGF- $\beta$ 1	TNF- $\alpha$	UCP 2	VEGF A
16	hyb ctl +	buffer	VEGF B	VEGF C	Wnt-10b	IS#4 (RBCS)	hyb ctl +
17	hyb ctl +	buffer	buffer	buffer	1 ctl +	2 ctl +	3 ctl +
18	4 ctl +	5 ctl +	6 ctl +	7 ctl +	8 ctl +	9 ctl +	10 ctl +

Figure 1.26. Représentation du « design » de l'adipochip avec les 89 sondes de capture pour les ADNc des gènes d'intérêt et les différents contrôles. Les différents contrôles sont en couleurs : contrôles d'hybridation négatifs en bleu, contrôles d'hybridation positifs en orange, standards internes en jaune, « buffer » en vert pâle et contrôle de fixation en gris.

Classes de gènes	Noms	Acronymes	N° NCBI
Hormones/cytokines/facteurs de croissance	Adipose complement-related protein 30	Acrp30	U37222
	adipsin	adipsin	NM_013459
	Angiotensinogen	Agt	NM_007428
	Interleukin-6	IL-6	NM_031168
	Leptin	Leptin	U18812
	Plasminogen activator-inhibitor-1	PAI-1	M33960
	Pigment Epithelium-Derived Factor	PEDF	AF036164
	renin	renin	J00621
	resistin	resistin	AF323080
	Stromal cell-derived factor-1	SDF-1	NM_021704
	Stromal cell-derived factor-2	SDF-2	NM_013655
	Secreted protein acidic and rich in cystein	SPARC	NM_009242
	Tissue Factor	TF	M26071
	Transforming-growth factor- $\beta$ 1	TGF- $\beta$ 1	NM_011577
	Tumor necrosis factor- $\alpha$	TNF- $\alpha$	XM_110221
	Vascular-endothelial growth factor	VEGF A	NM_009505
	Vascular-endothelial growth factor	VEGF B	NM_011697
	Vascular-endothelial growth factor	VEGF C	NM_009506
	Wnt-10b	Wnt-10b	U61970
Récepteurs membranaires	Angiotensin receptor I	ATR I	AF102548
	Angiotensin receptor II	ATR II	NM_007429
	$\beta$ 3-Adrenergic Receptor	$\beta$ 3-AR	NM_013462
	Endothelin receptor $\alpha$	ER $\alpha$	BC008277
Protéines de stress	Heat shock protein 60	HSP 60	X53584
	Heat shock protein 84	HSP 84	M36829
	Heat shock protein 86	HSP 86	NM_010480
Transporteurs membranaires	Amino acid transporter	AAAT	D85044
	Glucose transporter 4	GLUT-4	AB008453
	Chloride intracellular channel 4	mtCLIC/Clic4	NM_013885
Facteurs et machinerie de transcription	CCAAT/Enhanceer-binding protein $\alpha$	C/EBP $\alpha$	BC028890
	CCAAT/Enhanceer-binding protein $\beta$	C/EBP $\beta$	NM_009883
	CCAAT/Enhanceer-binding protein $\delta$	C/EBP $\delta$	NM_007679
	C/EBP homologous protein 10	CHOP10	X67083
	cAMP-responsive element-binding protein	CREB	NM_133828
	GATA-2	GATA-2	AB000096
	GATA-3	GATA-3	NM_008091
	Nuclear factor of activated T cells	NFATC2	NM_010899
	Nuclear factor of activated T cells	NFATC4	NM_023699
	Peroxisome proliferator-activated receptor $\delta$	PPAR $\delta$	XM_128500
	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$	PPAR $\gamma$	U01664
	Retinoïd-X-receptor $\alpha$	RXR $\alpha$	NM_011305
	Retinoïd-X-receptor $\gamma$	RXR $\gamma$	NM_009107
	Smad 3	Smad 3	AF016189
	Sterol-responseive element-binding protein-1	SREBP-1	AF374266
	Signal transducer and activator of transcription 6	Stat 6	NM_009284
	TATA-box binding protein (TFIID)	TBP	NM_013684
Protéines de structure	actin	actin	NM_007393
	Adducin 1	ADD1	NM_013457
	caveolin-1 $\beta$	cav-1 $\beta$	AB029930
	caveolin-2	cav-2	AF141322
	Collagen VI $\alpha$ 2	Coll VI $\alpha$ 2	X62332
	Cystatin C	Cst C	NM_009976
	Gelsolin	Gsn	NM_010354
	Matrix metalloprotease-2	MMP-2	NM_008610



Cycle cellulaire	Cyclin D3	Cyclin D3	NM_007632
	p18	p18	NM_007671
Métabolisme glucides/lipides	Acylation Stimulating Protein	ASP	K02782
	ATP Citrate Lyase	CL	AF332052
	liver-carnitin palmitoyl-transferase-1	CPT-1l	S82796
	muscle-carnitin palmitoyl-transferase-1	CPT-1m	AB010826
	Carnitin palmitoyl-transferase-2	CPT-2	NM_009949
	Dihydroxyacetone-phosphate-acyl transferase	DHAPAT	AF110769
	Fatty acid-binding protein 4	Fabp 4	NM_024406
	Fatty acid synthase	FAS	AF127033
	Glyceraldehyde-phosphate deshydrogenase	GAPDH	M32599
	Glycerol-phosphate-acyl transferase	GPAT mit	NM_008149
	Glycerol-phosphate deshydrogenase	GPD cyto	BC005756
	Glycerol-phosphate deshydrogenase	GPD mito	NM_010274
	Glycerol kinase	Gyk	U48403
	11-β hydroxysterol dehydrogenase	HSD-11β	NM_008288
	Hormone-sensitive lipase	HSL	U08188
	L-pyruvate kinase	l-PK	NM_013631
	Lipoprotein lipase 1	LPL-1	NM_008509
	Medium chain-acyl CoA dehydrogenase	MCAD	NM_007382
	Phosphoenolpyruvate carboxykinase-1	PEPCK-1	NM_011044
	Perilipin A	Plin A	NM_175640
	Stearoyl-CoA desaturase-1	SCD-1	BC007474
	Stearoyl-CoA desaturase-2	SCD-2	M26270
	Uncoupling protein-2	UCP-2	NM_011671
Transduction du signal	Calmodulin-dependent kinase II	CaMK II	NM_178597
	Calmodulin-dependent kinase IV	CaMK IV	X58995
	Endothelial nitric oxide synthase	eNOS	NM_010322
	Inducible nitric oxide synthase	iNOS	M92649
	p110 α	p110 α	U03279
Divers	ARN ribosomal 18 S	ARNr18S	XM_135640
	Haptoglobin	Hp	NM_017370
	Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide	HCNP	AB046417
	Pre-adipocyte factor-1	Pref-1	L12721
	member RAS oncogene family	RAB3D	BC020010

Tableau 1.1. Tableau reprenant les 89 gènes analysables sur l'"adipochip", répartis par classes.

ainsi permis d'identifier les gènes cibles de la trichostatine A et d'obtenir des informations sur les mécanismes par lesquels cet inhibiteur de l'adipogenèse agit (Burton, Nagarajan et al. 2004).

## 3.2 Analyse de l'expression génique par les microdamiers à ADN

### 3.2.1 Principe d'un microdamier à ADN

Un microdamier est composé d'un support solide, souvent une lame de verre, sur lequel sont fixés, de manière covalente ou non, des ADN correspondant à un fragment de la séquence des ARNm des gènes à étudier. Ces fragments de séquence d'ADN constituent donc des sondes trappeurs sur lesquelles vont venir s'hybrider des séquences cibles d'ADNc (ADN complémentaire). Ces cibles sont obtenues par la rétrotranscription d'ARNm, extraits de cellules ou de tissus. Lors de l'étape de rétrotranscription, les ADNc nouvellement synthétisés, reflet de l'abondance des ARNm, sont marqués suite à l'incorporation de nucléotides modifiés (Manduchi, Searce et al. 2002).

### 3.2.2 Présentation du microdamier « adipochip » utilisé dans ce travail

L'« adipochip » utilisée au cours de ce travail est un damier à ADN de faible densité qui comporte 89 sondes trappeurs permettant l'étude de l'expression (au niveau de l'abondance des transcrits) de 89 gènes (figure 1.26). Ces trappeurs ont été choisis dans le cadre de la thèse de S. Vankoningsloo, sur base de la littérature existante portant sur des gènes dont l'expression est modifiée au cours de la différenciation des pré-adipocytes 3T3-L1.

Parmi les sondes de capture présentes sur l'« adipochip », on retrouve notamment des sondes pour les transcrits de gènes codant des facteurs de transcription connus pour réguler la différenciation adipocytaire, des hormones et des cytokines synthétisées et libérées par les adipocytes (les adipokines), des protéines marqueurs spécifiques du phénotype adipocytaire et des enzymes responsables de l'accumulation de triglycérides cytosoliques. Certains gènes, dont l'expression est analysable par l'« adipochip », ont également été choisis parce que la fonction de leur produit dans le tissu adipeux est peu connue. Les 89 sondes trappeurs présentes sur l'« adipochip » ont été réparties en 10 classes (tableau 1.1.). Nous sommes conscients que les informations à donner pour chacun de ces 89 gènes pourraient faire l'objet d'une introduction complète. De nombreux gènes ayant déjà été décrits dans les chapitres précédents, nous décrivons ci-dessous brièvement les effets de certaines protéines codées par des gènes dont nous n'avons pas encore parlé.

#### 3.2.2.1 Hormones/Cytokines/Facteurs de croissance

Outre sa fonction de réserve d'énergie, le tissu adipeux blanc possède également une fonction sécrétoire dont les produits ont des effets endo-, auto- et paracrines. Les adipokines regroupent des cytokines et certaines protéines sécrétées par le tissu adipeux et qui partagent des propriétés structurales. Elles pourraient jouer un rôle important dans le comportement alimentaire, la tension vasculaire, la balance énergétique, la sensibilité à l'insuline et le métabolisme des graisses. Les adipokines dont l'expression génique est analysable par l'*adipochip* sont la leptine, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 (*interleukin-6*), la résistine, l'adiponectine, l'adipsine, le TGF $\beta$ 1 (*transforming growth factor  $\beta$ 1*), le PAI-1 (*plasminogen activator-inhibitor-1*), et l'Agt (*angiotensinogen*).

La leptine codée par le gène *ob* est une adipokine de 16 kDa pléiotrope, découverte en 1994 par Friedman et ses collaborateurs. Cette hormone est sécrétée principalement par les adipocytes blancs mais également par le tissu adipeux brun, le placenta, l'estomac, les os et la



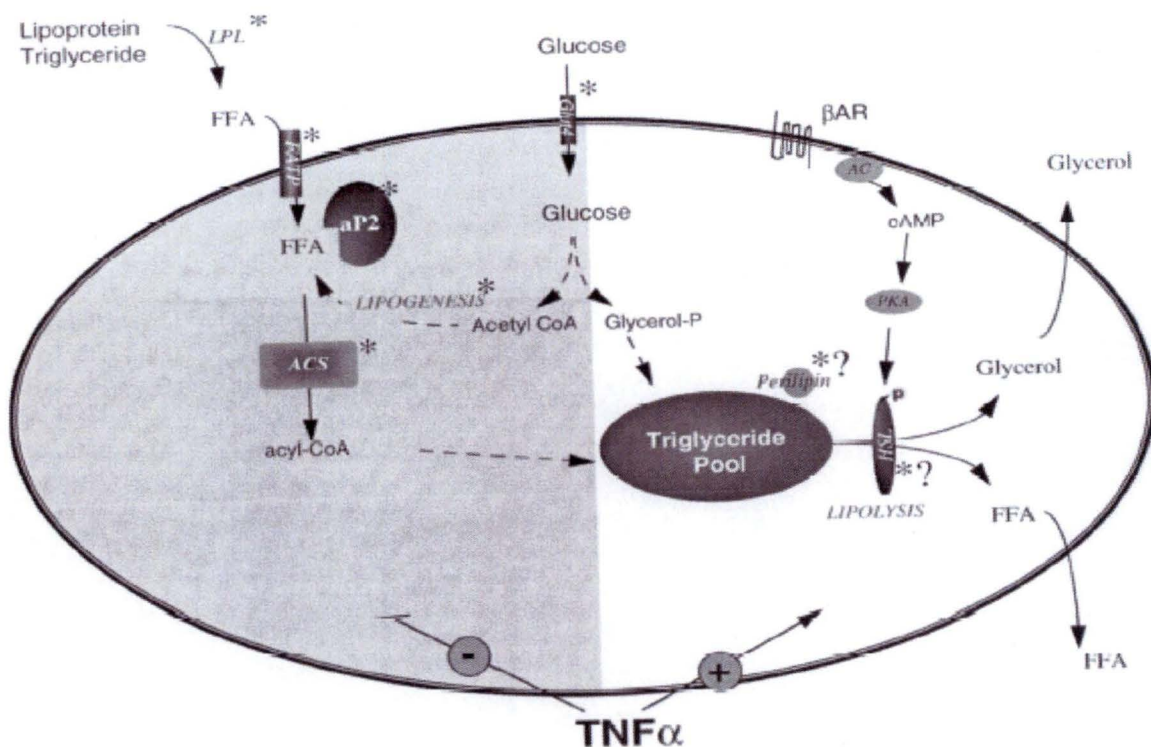


Figure 1.27. Schéma reprenant les différentes actions du  $\text{TNF-}\alpha$  sur le métabolisme lipidique dans les adipocytes. Le  $\text{TNF-}\alpha$  induit une diminution de l'entrée des acides gras et de la synthèse des triglycérides en augmentant la lipolyse. LPL : lipoprotein lipase; FFA : free fatty acids; FATP : fatty acid transporter protein; aP2 : adipocyte fatty acid binding protein; ACS : acyl-CoA synthetase; HSL : hormone sensitive lipase;  $\beta$ -AR :  $\beta$ -adrenergic receptor; AC : adenylate cyclase; PKA : protein kinase A; Glut4 : Glucose Transporter 4. Les astérisques indiquent les protéines dont l'activité et/ou l'expression est régulée négativement par le  $\text{TNF-}\alpha$  mais régulée positivement par le facteur  $\text{PPAR}\gamma$  et ses ligands (Sethi and Hotamisligil, 1999).

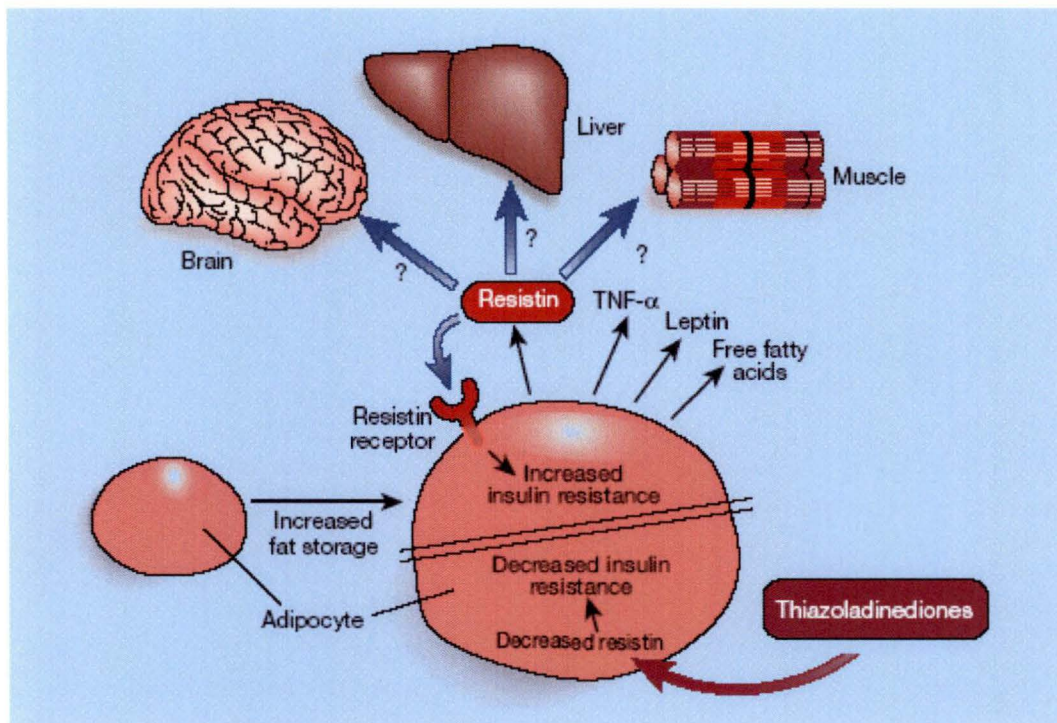


Figure 1.28. L'obésité rend certains tissus tels que le foie, les muscles et le tissu adipeux moins sensibles à l'insuline. La résistance à l'insuline est une caractéristique majeure du diabète de type II. Sur le schéma, les adipocytes accumulent plus de vésicules de triglycérides (hypertrophie) et sécrètent des adipokines qui peuvent modifier la sensibilité des tissus à l'insuline. Les acides gras libres et le TNF- $\alpha$  peuvent induire une résistance à l'insuline, et la leptine, qui régule la balance énergétique, augmente probablement la sensibilité des tissus à l'insuline. Les médicaments de type thiazoladinedione diminuent la résistance à l'insuline, entre autres, en supprimant l'expression de la résistine dans les adipocytes et constituent donc un traitement pour les patients atteints de diabète de type II (Flier, 2001).

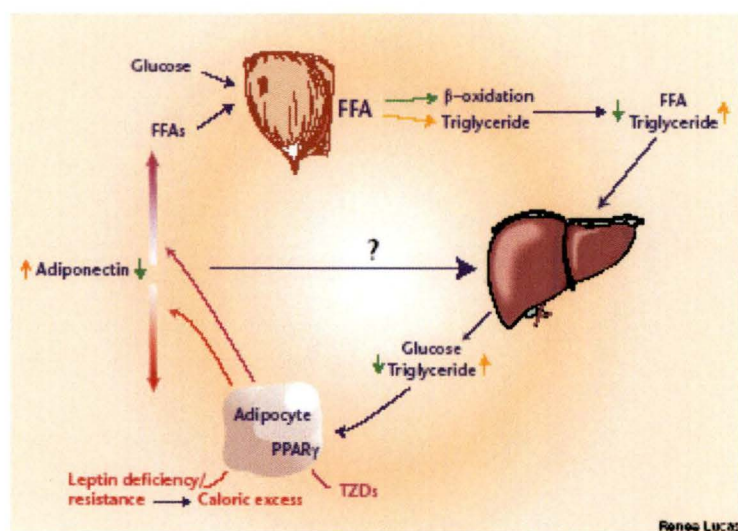


Figure 1.29. Modèles hypothétiques de la sécrétion et de l'action de l'adiponectine. La synthèse et la sécrétion de l'adiponectine est augmentée par l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  et réduite par un excès calorique associé à une résistance à l'insuline. L'adiponectine libérée peut augmenter directement le transport des acides gras et l'oxydation dans les muscles squelettiques. Elle peut réduire le taux de lipides intramyocellulaire et par conséquent améliorer la transduction du signal initiée par l'insuline. (Saltiel, 2001).



glande pituitaire (Trayhurn 2003) et possède de nombreuses actions dans le système nerveux central (hypothalamus) et les tissus périphériques. Le bilan de son action est fonction de sa concentration, proportionnelle à la masse de tissus adipeux. Elle régule notamment la masse de ce tissu en réprimant la consommation des aliments et en augmentant les dépenses énergétiques (Cohen, Barkan et al. 2001). La fonction anorexigénique de la leptine résulte de son action activatrice sur une population neuronale qui produit des neuropeptides anorexigéniques, POMC (*proopiomelanocortin*) et CART (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*) et de son action inhibitrice sur une population de neurones qui produit des neuropeptides orexigéniques, NPY (*neuropeptide Y*) et AgRP (*agouti-related protein*) (Elmqvist and Flier 2004).

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire produite principalement par les macrophages et les lymphocytes, mais également exprimée et sécrétée par les adipocytes. Le gène codant la protéine TNF- $\alpha$  est surexprimé chez les sujets obèses et cette cytokine contribue à la résistance à l'insuline ((Kanety, Feinstein et al. 1995); (Paz, Hemi et al. 1997)). En plus de l'induction de la résistance à l'insuline, le TNF- $\alpha$  induit la production de leptine, stimule la lipolyse, inhibe la lipogenèse, induit la différenciation adipocytaire et l'apoptose des cellules adipeuses et empêche la différenciation des pré-adipocytes *in vitro* (figure 1.27). Il inhibe également l'expression de l'adiponectine et stimule la production d'IL-6 et de la résistine par le tissu adipeux blanc (Beltowski 2003).

L'IL-6 est une protéine glycosylée de la famille des cytokines dont le poids moléculaire (22 à 27 kDa) varie en fonction de la source cellulaire et du degré de glycosylation. Elle est synthétisée principalement par les monocytes, les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales vasculaires (Febbraio and Pedersen 2002). Elle est en outre exprimée et sécrétée par les adipocytes (Mohamed-Ali, Flower et al. 2001). Les stimuli classiques qui induisent la production d'IL-6 sont l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  (Febbraio and Pedersen 2002). A l'instar du TNF- $\alpha$ , le taux d'IL-6 circulante est donc remarquablement élevé chez les sujets obèses (Mohamed-Ali, Flower et al. 2001). L'IL-6 diminue l'expression et l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) dans le tissu adipeux murin *in vivo* et dans les adipocytes 3T3-L1 murins *in vitro*. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 sont donc deux cytokines identifiées à l'origine comme des molécules pro-inflammatoires mais qui possèdent également des effets induisant la résistance à l'insuline.

La résistine appartient à la famille des protéines sécrétées riches en cystéines, les RELM (*resistin-like molecules*) ou FIZZ (*found in inflammatory zone*). Elle est exprimée exclusivement dans le tissu adipeux blanc et son expression est rapidement augmentée dans les pré-adipocytes en différenciation (Beltowski 2003). L'expression et la sécrétion de cette protéine sont diminuées par les médicaments anti-diabétiques de type thiazolidinedione. Cette hormone adipocytaire est décrite pour contribuer à la résistance à l'insuline (figure 1.28) (Steppan, Bailey et al. 2001). En effet, des anticorps dirigés contre la résistine ont pour effet une diminution du glucose sanguin et une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les souris obèses (Beltowski 2003). Comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, la résistine est surexprimée chez les souris obèses de type ob/ob (mutation du gène codant la leptine), db/db (mutation du gène codant le récepteur à la leptine) ou chez les animaux dont l'obésité est induite par un régime riche en lipides (Beltowski 2003).

L'adiponectine, ou Acrp30 (figure 1.29) (*adipocyte complement-related protein of 30 kDa*) est exprimée et sécrétée exclusivement par les adipocytes différenciés et cette protéine plasmique est 1000 fois plus abondante que la résistine (Tsao, Lodish et al. 2002). Chez l'homme, l'Acrp30 est composée de 244 aa et possède un domaine globulaire C-terminal et un domaine de type collagène. Cette adipokine possède une analogie structurale avec la fraction Cq du complément. L'adiponectine augmente la tolérance au glucose en augmentant la sensibilité à l'insuline. Contrairement à d'autres adipokines qui sont surexprimées chez les

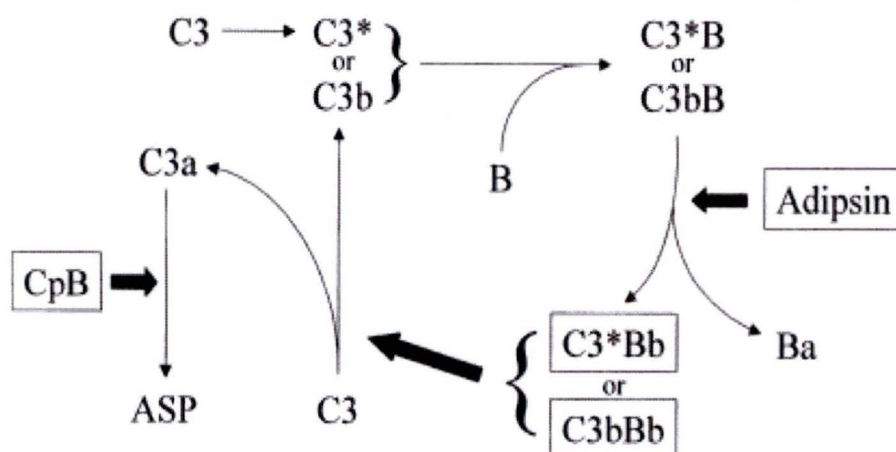


Figure 1.30. Schéma illustrant la conversion du complément C3 en ASP (Acylation-Stimulating Protein). Le C3 est convertit spontanément pour activer un analogue de C3b qui est complexé au facteur B et forme du C3bB. L'adipsine clive le lien du facteur B et génère les éléments C3bBb et Ba. La molécule C3bBb est une convertase active qui clive le C3 en C3a et C3b. La carboxypeptidase B clive à son tour l'arginine N-terminale de l'élément C3a pour produire de l'ASP (Cianflone et al., 2003).



sujets obèses, l'expression et la sécrétion de l'Acrp30 sont diminuées. Le mécanisme responsable d'une diminution de la sécrétion d'Acrp30 chez les sujets obèses est peu compris. Cependant, comme l'expression de l'adiponectine est stimulée par l'insuline et inhibée par le TNF- $\alpha$ , la résistance à l'insuline induite par l'augmentation de l'expression de TNF- $\alpha$  pourrait contribuer à cet effet (Beltowski 2003). En outre, l'Acrp30 augmente l'expression de gènes codant pour les protéines CD36, acyl-CoA oxydase et UCP2 (*uncoupling protein-2*), qui sont respectivement impliquées dans les processus de transport des acides gras et du cholestérol, d'oxydation des acides gras et de dissipation d'énergie sous forme de chaleur suite à un découplage de la mitochondrie.

L'adipsine, ou facteur D du complément, est surexprimée de manière transcriptionnelle et post-transcriptionnelle au cours de l'adipogenèse (Kratchmarova, Kalume et al. 2002). C'est une enzyme clé dans la production d'ASP (*acylation stimulating protein*) (figure 1.30). En effet, l'ASP est une petite protéine générée à partir du facteur B, du troisième composant du complément, la protéine C3, et de l'adipsine (Cianflone 2003). Dans les adipocytes, l'ASP et l'insuline sont des stimulants puissants de la synthèse des triglycérides *in vitro*. En effet, l'ASP augmente l'activité de la diacylglycérol acyltransférase, la dernière enzyme impliquée dans la synthèse des triglycérides. L'ASP stimule aussi l'incorporation des acides gras libres et leur estérification dans les adipocytes blancs, induit la translocation des transporteurs de glucose (GLUT-1, 3 et 4) dans la membrane plasmique et inhibe la HSL (*hormone-sensitive lipase*) ((Sniderman, Cianflone et al. 1998) ; (Cianflone 2003)).

La protéine TGF- $\beta$  est un inhibiteur de la différenciation adipocytaire. Pourtant, malgré sa capacité à inhiber l'adipogenèse, TGF- $\beta$  est exprimé dans les adipocytes en culture et dans le tissu adipeux. Sa fonction dans l'adipogenèse et son mécanisme d'action ne sont pas connus (Choy, Skillington et al. 2000).

PAI-1 est une glycoprotéine composée de 379 aa qui appartient à la superfamille des « serpin » (*serine protease inhibitor*). La protéine PAI-1 inhibe la conversion du plasminogène en plasmine, une enzyme qui hydrolyse la fibrine dans les caillots sanguins. Le niveau de PAI-1 plasmatique est plus important chez les sujets obèses (Mertens and Van Gaal 2002). Ceci pourrait être expliqué par l'hypertrophie et l'hyperplasie du tissu adipeux chez les sujets obèses, mais également par le fait que le TNF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$ , produits par les adipocytes, stimulent la biosynthèse du PAI-1 dans les adipocytes. Des concentrations plasmatiques élevées en PAI-1 constituent donc un risque élevé pour les maladies cardiaques coronariennes associées à l'obésité (Loskutoff and Samad 1998).

### 3.2.2.2 Récepteurs membranaires

Cette classe comporte des gènes codant les protéines ATRI (*angiotensin II receptor type I*), ATRII (*angiotensin II receptor type II*),  $\beta$ 3-AR ( *$\beta$ 3-adrenergic receptor*) et ER $\alpha$  (*endothelin receptor- $\alpha$* ).

L'angiotensine II est produite suite à l'action protéolytique et séquentielle de la rénine et de l'ACE (*angiotensin-converting enzyme*) sur le précurseur angiotensinogène (Mallow, Trindl et al. 2000). Le système rénine-angiotensine (*renin-angiotensin system*, RAS) joue un rôle crucial dans le maintien de la pression sanguine par son action constrictrice sur les muscles lisses des vaisseaux sanguins. Il agit également sur les systèmes nerveux et rénal en stimulant respectivement la sécrétion d'aldostérone et le transport des électrolytes. Ce système hormonal existe aussi localement dans le tissu adipeux. L'angiotensine II favorise la croissance adipocytaire et le recrutement des pré-adipocytes (Engeli, Schling et al. 2003). Le récepteur ATRI est présent tout au long de la différenciation des pré-adipocytes 3T3-L1 en adipocytes alors que l'expression du récepteur ATRII est réprimée au cours de l'adipogenèse (Mallow, Trindl et al. 2000).



Les trois isoformes ( $\beta 1$ -AR,  $\beta 2$ -AR et  $\beta 3$ -AR) du récepteur  $\beta$ -AR appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. Contrairement aux récepteurs  $\beta 1$ -AR et  $\beta 2$ -AR qui sont exprimés de manière ubiquiste, le récepteur  $\beta 3$ -AR est exprimé assez tardivement au cours de l'adipogenèse par les adipocytes. Ces trois isoformes activés par des ligands comme le glucagon ou une catécholamine, couplés à l'activation de l'adénylate cyclase, induisent l'augmentation de la concentration en AMPc et donc l'activation de la PKA. L'activation de la PKA induit la lipolyse, ou mobilisation des triglycérides, dans les adipocytes blancs par l'activation de la HSL (*hormone-sensitive lipase*) (Greenberg, Shen et al. 2001). La HSL est une enzyme cytosolique qui catalyse l'hydrolyse des triglycérides dans les adipocytes et par conséquent favorise la mobilisation des graisses et la libération des acides gras dans le sang lors d'une demande énergétique. Une invalidation du gène codant pour le récepteur adrénergique  $\beta 3$  chez des souris femelles entraîne une augmentation de leurs masses corporelle et adipeuse. Ceci suggère que le récepteur adrénergique  $\beta 3$  pourrait jouer un rôle crucial dans la régulation de l'accumulation des graisses chez les mammifères (Tachibana, Takagi et al. 2003). La stimulation du récepteur adrénergique  $\beta 3$  est également responsable de la thermogenèse adaptative (au froid, à l'excès de nutriments) dans les adipocytes bruns suite à l'augmentation de l'expression d'UCP-1 ((Collins and Surwit 2001); (Susulic, Frederick et al. 1995); (Tachibana, Takagi et al. 2003)).

### 3.2.2.3 Transduction du signal

Cette classe comporte des gènes codant les kinases CaMKII et CaMKIV, dont la fonction dans l'adipogenèse a été décrite au paragraphe 2.1.2.3, et les protéines eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*), iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) et p110 $\alpha$ , un isoforme de la sous-unité catalytique de la PI3K.

### 3.2.2.4 Facteurs de transcription et machinerie de transcription

Comme nous l'avons vu au paragraphe 2.1.2.3, la différenciation adipocytaire est régulée par l'activation séquentielle et ordonnée de plusieurs facteurs de transcription dont l'expression et/ou l'activité augmente après induction de l'adipogenèse par un cocktail pro-adipogène. Les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation adipocytaire et présents sur l'*adipochip* sont : C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , CHOP 10 (*C/EBP homologous protein*), CREB, GATA-2, GATA-3, NFATC-2 (*nuclear factor of activated T cells-2 et -4*), NFATC-4, PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ , RXR $\gamma$ , SREBP-1, Smad 3, Stat 6 et TBP (*tata binding protein*).

Les membres de la famille des facteurs de transcription GATA possèdent un domaine en doigts de zinc de liaison à l'ADN fortement conservé. Les facteurs de transcription GATA-2 et GATA-3 sont spécifiquement exprimés dans les précurseurs des adipocytes blancs. Leur expression constitutive supprime la différenciation adipocytaire en inhibant directement l'expression du facteur PPAR $\gamma$ . Ils maintiennent donc les pré-adipocytes dans un état indifférencié. La répression de ces marqueurs pré-adipocytaires est donc nécessaire à la mise en place de la différenciation terminale.

### 3.2.2.5 Métabolisme des glucides et des lipides

L'*adipochip* comporte également des sondes de capture permettant l'analyse de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la biosynthèse et dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Ce microdamier permet également d'analyser l'expression de gènes codant des enzymes de la glycolyse comme la l-PK (*liver-pyruvate kinase*). En effet, la l-PK constitue la dernière enzyme de la glycolyse et catalyse la conversion du phosphoénolpyruvate en pyruvate (Uyeda, Yamashita et al. 2002).



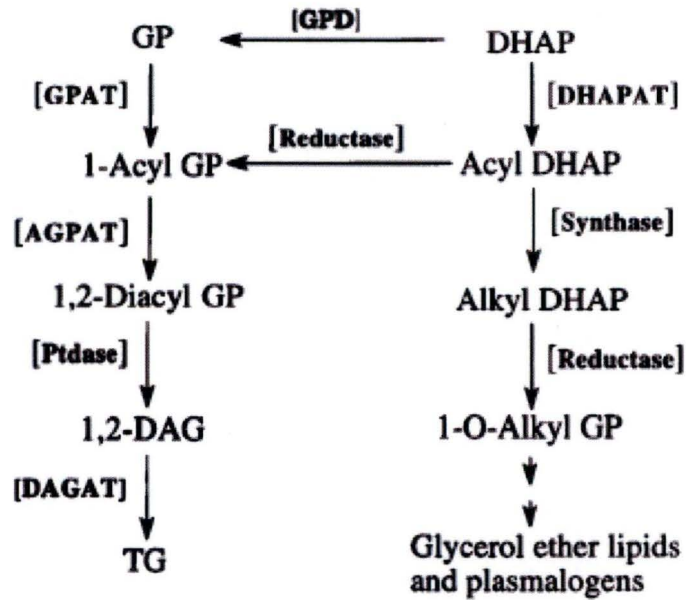


Figure 1.31. Ensemble des réactions conduisant à la synthèse des triglycérides à partir de GlycéroPhosphate (GP). L'activité de l'enzyme DHAPAT (dihydroxyacetone phosphate acyltransferase) initie, en présence d'acyl-DHAP, une cascade enzymatique qui produit 40 à 50 % des triglycérides contenus dans les adipocytes matures (Hajra et al., 2000).

La PEPCK (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*) cytosolique possède différentes fonctions selon sa localisation tissulaire. Ainsi, elle participe à la néoglucogenèse dans le foie, et à la glycéronéogenèse dans le tissu adipeux. Elle catalyse la conversion de l'oxaloacétate en phosphoenolpyruvate, étape limitante de ces deux processus ((Beale, Forest et al. 2003); (Tontonoz, Hu et al. 1995)). Elle est exprimée constitutivement dans les tissus hépatique et adipeux (Tontonoz, Hu et al. 1995).

La CL (*citrate lyase*) est une enzyme cytosolique essentielle dans la lipogenèse. En effet, l'acétyl-CoA, un précurseur de la synthèse *de novo* des acides gras dans le cytosol, est produit par la PDH (*pyruvate dehydrogenase*) à partir du pyruvate et lors de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Il traverse les membranes de la mitochondrie sous forme de citrate et est retransformé en acétyl-CoA par la CL (Swergold, Rosen et al. 1982).

Comme nous l'avons vu, les pré-adipocytes accumulent des triglycérides au cours de l'adipogenèse. La biosynthèse des acides gras se déroule dans le cytosol et la synthèse des triglycérides nécessite l'activation séquentielle d'enzymes lipogéniques.

Ainsi, la FAS joue un rôle central dans la lipogenèse : elle catalyse la synthèse des longues chaînes d'acides gras par la formation de palmitate à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA. Cette enzyme catalyse la synthèse des acides gras et l'accumulation de triglycérides dans le tissu adipeux, le cerveau, le foie et les glandes lactiques de mammifères (Weiss, Rosen et al. 1980).

Les SCD (*stearoyl-CoA désaturase*) constituent les enzymes régulatrices clés dans la biosynthèse des acides gras insaturés. Ainsi, la SCD-1 catalyse la synthèse des acides palmitoléique et oléique qui sont les formes principales d'acides gras insaturés retrouvés dans les triglycérides des adipocytes 3T3-L1. Son activité est donc fortement augmentée au cours de l'adipogenèse. L'isoforme SCD-2 joue également un rôle catalytique dans le stockage des acides gras mono-insaturés dans les triglycérides (Kaestner, Ntambi et al. 1989).

Au cours de la transformation du DHAP (*dihydroxyacetone phosphate*) en triglycérides (figure 1.31), la GPD cytosolique (*glycerophosphate dehydrogénase*) qui catalyse la formation de sn-glycérol 3-phosphate, et la GPAT mitochondriale (*glycerophosphate acyltransferase*) (insérée dans la membrane mitochondriale externe) qui catalyse la formation de 1-acyl-GP, sont fortement induites (Hajra, Larkins et al. 2000).

*In vivo*, la LPL (*lipoprotein lipase*) est synthétisée et sécrétée par les adipocytes, puis transportée à la surface des cellules endothéliales des capillaires tissulaires. Dans le milieu extracellulaire, cette enzyme hydrolyse les lipoprotéines riches en triglycérides. Son activité dans le tissu adipeux est régulée par des facteurs hormonaux et nutritionnels (Amri, Teboul et al. 1996).

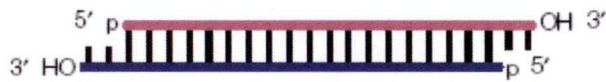
### 3.2.2.6 Divers

Pref-1 est une protéine transmembranaire codée par le gène *pref-1/dlk1*. Elle appartient à une famille de protéines contenant des domaines répétés de type EGF (*epithelial growth factor*) et son expression est fortement exprimée dans les pré-adipocytes et complètement réprimée dans les adipocytes. Son domaine extracellulaire est clivé par protéolyse partielle pour générer deux facteurs solubles de 50 et 25 kDa. Pref-1 possède une fonction anti-adipogénique en inhibant l'expression de C/EBP $\beta$  et son expression est réprimée par les glucocorticoïdes lors de l'initiation de l'adipogenèse des 3T3-L1 (Lee, Villena et al. 2003).

Lorsque l'on s'intéresse à l'analyse de l'expression différentielle de gènes en utilisant l'outil des damiers à ADN, on peut être tenté de modifier l'expression d'un gène candidat et d'étudier les changements collatéraux d'expression de gènes induits suite, par exemple, à la répression de l'expression du gène d'intérêt. Cette approche est de plus très intéressante



A.



B.

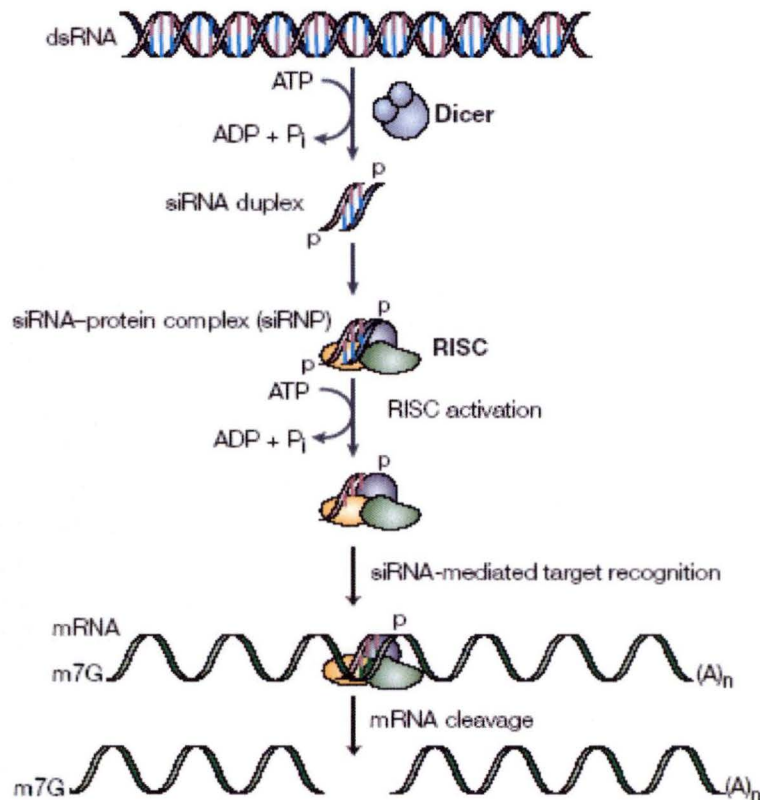


Figure 1.32. Schéma illustrant le mécanisme RNAi initié par le clivage de longs RNA double brins en siRNA double brins de 19 à 21 nucléotides (A) présentant une extrémité 3' protrudante de deux nucléotides. Le clivage des longs ARN double brin est effectué par un complexe enzymatique, DICER (B). Les siRNA double brins générés sont reconnus par le complexe RISC et désappariés puis le siRNA simple brin anti-sens dirige RISC vers l'ARNm de séquence complémentaire. Il s'ensuit une dégradation du transcrit cible par RISC (Dykxhoorn et al., 2003).

lorsque ce gène candidat code pour un facteur de transcription. De plus, avec la découverte récente du mécanisme RNAi, il est maintenant possible d'inhiber l'expression d'un gène dans des cellules eucaryotes de mammifères sans devoir au préalable établir des lignées de cellules provenant d'animaux. La combinaison de l'outil RNAi et de l'expression de gènes par des microdamiers a déjà été utilisée pour identifier des gènes dont l'expression est induite par le TNF- $\alpha$  et régulée par NF- $\kappa$ B (Zhou, Scoggin et al. 2003).

## 4 Le mécanisme *RNA interference* (RNAi)

### 4.1 Bref historique de la découverte du mécanisme RNAi

Au début des années 1990, les équipes Jorgensen *et al.* (1990) et Romano *et al.* (1992) se trouvent confrontées à un processus d'inhibition, séquence spécifique, de l'expression génique de mécanisme inconnu, respectivement le PTGS (*post-transcriptional gene silencing*) chez les plantes et le *quelling* chez *Neurospora crassa*. En 1998, Fire et ses collaborateurs découvrent que l'injection d'ARN double brins (ARNdb) dans le nématode *Caenorhabditis elegans* conduit à une inhibition ciblée de l'expression génique (Fire, Xu et al. 1998) ; ils nomment ce processus RNAi. En 1999, l'équipe de Baulcombe observe la formation de petites séquences d'ARN complémentaires de l'ARN ciblé dans le processus PTGS induit par un virus. En 2000 et 2001, les équipes de Zamore, Hammond et Bernstein découvrent les principales étapes du mécanisme d'inhibition RNAi. De longs brins d'ARN injectés chez *Drosophila melanogaster* sont clivés en petits ARN de 21 à 23 nucléotides, les siRNA (*small interfering RNA*) et l'injection directe de siRNA double brins synthétiques induit la dégradation de l'ARNm homologue (Zamore, Tuschl et al. 2000). Les siRNA sont associés à un complexe protéique, RISC (*RNA-inducing silencing complex*). Une RNase de classe III, au sein d'un complexe protéique nommé DICER, coupe les dsRNA en siRNA de taille uniforme.

Actuellement, ce système d'inhibition de l'expression de gènes par des siRNA fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques tant d'un point de vue compréhension du mécanisme, qu'au niveau de l'utilisation de ce mécanisme comme outil d'inhibition ciblée de l'expression génique.

### 4.2 Le fonctionnement du mécanisme RNAi

Trois grands mécanismes d'inhibition par le processus RNAi sont connus : la dégradation de l'ARNm homologue initiée par le clivage d'ARNdb en siRNA, l'inhibition de la traduction de l'ARNm homologue initiée par le clivage de *hairpin* en miRNA (*micro RNA*) et l'inhibition de l'expression génique au niveau transcriptionnel par l'activation d'une hétérochromatinisation dans la région cible (Zeng, Yi et al. 2003). Dans le cadre de ce mémoire, nous nous intéressons uniquement au mécanisme d'inhibition de l'expression génique par les siRNA.

#### 4.2.1 Mécanisme de dégradation du transcrit cible médié par les siRNA

Les ARNdb longs, d'origine endogène ou exogène, sont clivés par l'enzyme DICER en petits ARNdb de 21 à 23 nucléotides par une réaction dépendante de l'ATP (figure 1.32). Les petits ARNdb présentent une extrémité 5' phosphorylée et une extrémité 3' protrudante de 2 nucléotides portant un groupement hydroxyle. Cette structure est caractéristique d'un clivage enzymatique effectué par une RNase de type III. Les RNases de type III sont une composante d'un complexe protéique, DICER, qui contient également un domaine hélicase et



deux domaines de liaison à l'ARNdb. Les petits ARN interférants double brins, nommés siRNA, produits par l'activité enzymatique de DICER, sont incorporés dans un second complexe enzymatique, RISC (*RNA-induced silencing complex*). Seuls les siRNA possédant leur extrémité 5' phosphorylée sont incorporés dans ce complexe. Le désappariement des deux brins des duplex siRNA par le complexe RISC est également dépendante de l'ATP. Le siRNA simple brin anti-sens guide le complexe RISC vers l'ARNm dont la séquence est complémentaire du brin anti-sens, et RISC initie le clivage endonucléotidique de l'ARNm cible (Dykxhoorn, Novina et al. 2003).

#### 4.2.2 Amplifications de l'effet RNAi

Deux modèles d'amplification du système RNAi ont été proposés chez certains organismes (les plantes, *C. elegans* et *N. crassa*): une enzyme RdRP (*RNA-dependent RNA polymerase*) allongerait l'extrémité 3' hydroxylée du brin ARN antisens lié à sa séquence ARNm homologue ou bien les siRNA s'assembleraient successivement sur leur ARNm homologue et une RNA ligase effectuerait une ligation entre les siRNA (Scharwz et al., 2002). Mais, à notre connaissance, aucun système d'amplification du mécanisme RNAi n'a encore été mis en évidence chez les mammifères.

### 4.3 Le système RNAi, signification biologique et outil moléculaire

#### 4.3.1 Signification biologique

Le mécanisme RNAi protège des infections virales les tissus des végétaux. En effet, lors de sa réplication, le virus à ARN forme de l'ARN double brin intermédiaire qui pourrait être la cible du mécanisme RNAi. Cette fonction de défense anti-virale des siRNA endogènes n'a pas (encore) été démontrée chez les vertébrés (McManus and Sharp 2002).

Le système RNAi aurait également une action de protection contre les transgènes contenant des régions répétées de type IR (*inverted repeat*) qui peuvent former des *hairpins* ; il jouerait ainsi le rôle d'un « système immunitaire » propre aux acides nucléiques (Denli et al., 2003).

En outre, le mécanisme RNAi peut induire l'hétérochromatinisation de certaines régions et donc rendre silencieuse certaines régions du génome (séquences répétées, centromère ou séquence cible) (Schramke and Allshire 2003).

Enfin, le mécanisme RNAi intervient également pour contrôler la temporalité d'événements au cours du développement de *C. elegans* en régulant *in vivo* l'expression de deux gènes, *lin-4* (*lineage-abnormal-4*) et *let-7* (*lethal-7*) (McManus and Sharp 2002).

#### 4.3.2 Outil moléculaire

L'utilisation de siRNA pour inhiber l'expression génique représente un outil puissant dans l'exploration des fonctions de gène et le développement de thérapies anti-virales (McManus and Sharp 2002). Plusieurs techniques sont utilisées *in vitro* pour produire l'outil RNAi.

##### 4.3.2.1 Les techniques de production de l'outil RNAi

Le mécanisme RNAi intracellulaire peut être stimulé par l'introduction de siRNA synthétisés chimiquement, de longs dsRNA ou encore par l'introduction de constructions plasmidiques particulières. Il peut s'agir d'une transfection de cellules avec un plasmide contenant la séquence partielle ou entière du gène à éteindre et clonée de manière à obtenir

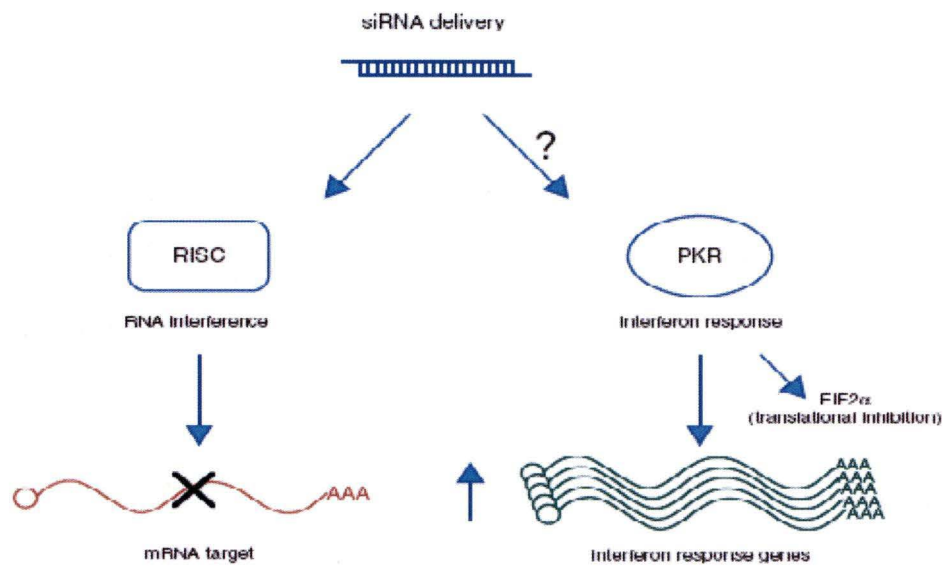


Figure 1.33. Effets spécifiques et potentiellement non spécifiques des siRNA. Les siRNA double brins sont des inhibiteurs spécifiques de l'expression génique mais ils peuvent également entraîner une réponse non spécifique caractérisée par l'induction du système interféron, un mécanisme de défense anti-virale. En effet, l'introduction de longs ARN double brins induit d'une part la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  (elongation initiation factor-2 $\alpha$ ) par activation d'une kinase, la PKR (RNA-dependent protein kinase R) et d'autre part l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de la réponse interféron. La phosphorylation du facteur eIF-2 $\alpha$  entraîne un arrêt de la synthèse globale des protéines, et par conséquent la mort cellulaire par apoptose. Lorsque la réponse interféron reste modérée, l'apoptose n'est pas initiée mais un effet aspécifique de l'outil RNA est observé (Moss and Taylor, 2003)



une *hairpin* RNA post-transcription avec un plasmide contenant une séquence codant pour un ARN anti-sens ou encore avec deux plasmides codant respectivement pour une séquence sens et anti-sens (Dykxhoorn, Novina et al. 2003).

#### 4.3.2.2 *Les limites de la technique RNAi*

Malgré son action inhibitrice séquence spécifique démontrée, le mécanisme RNAi présente quelques limitations comme outil moléculaire.

La transduction de siRNA dans des cellules de mammifères entraîne une diminution transitoire et partielle de l'expression du gène d'intérêt et non une inhibition prolongée et totale de cette expression. Les siRNA étant relativement résistants à la dégradation, la nature transitoire de la réponse globale est déterminée par le taux de cellules transfectés et leur état de prolifération responsable d'une éventuelle dilution des siRNA sous un seuil crucial nécessaire au maintien de l'inhibition de l'expression génique (Dykxhoorn, Novina et al. 2003). Un autre facteur qui limite l'inhibition de l'expression de gènes par les siRNA est le temps de demi-vie de la protéine. En effet, il est plus difficile d'éteindre l'expression d'un gène codant pour une protéine possédant un temps de demi-vie élevé par une transfection transitoire des siRNA car il faudrait exposer l'ARNm aux siRNA pendant un temps plus long (Dykxhoorn, Novina et al. 2003).

Enfin, l'outil RNAi est parfois difficile d'utilisation dans les cellules somatiques de mammifères car il peut entraîner une réponse non spécifique caractérisée par l'induction du système interféron, un mécanisme de défense anti-virale et une inhibition globale de la traduction protéique (figure 1.33) (Moss and Taylor 2003).

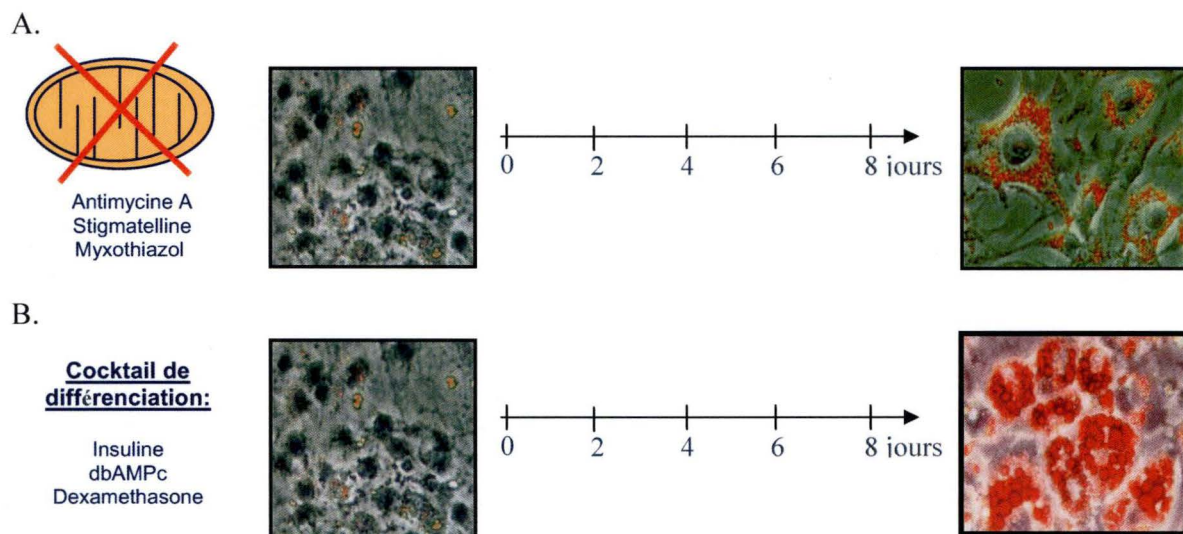


Figure 1.34. Les pré-adipocytes 3T3-L1 incubés en présence d'un inhibiteur des phosphorylations oxydatives pendant 8 jours présentent une modification de leur phénotype avec le maintien de leur forme fibroblastique mais l'accumulation de multiples petites vésicules de triglycérides dans le cytosol. Les pré-adipocytes incubés en présence du cocktail pro-adipogène pendant 8 jours présentent une hypertrophie caractéristique des cellules différenciées et une accumulation de grosses vésicules de triglycérides dans leur cytosol. La présence des triglycérides cytosoliques est révélée par une coloration des graisses neutres à l'Oil Red O et des micrographies des cellules sont prises au microscope à contraste de phase.



## Contexte de la recherche, objectifs et stratégies

### 1 Contexte de la recherche

Certaines maladies mitochondriales, induites *in fine* par une diminution des phosphorylations oxydatives, s'accompagnent d'une perturbation du métabolisme lipidique, avec notamment l'accumulation de triglycérides. Cet aspect des maladies mitochondriales et les mécanismes moléculaires qui relient le dysfonctionnement mitochondrial aux modifications de la synthèse, de l'accumulation ou de la mobilisation des triglycérides ont été très peu étudiés dans les cellules de mammifères en général et dans les cellules adipeuses en particulier.

S. Vankoningsloo (thèse en cours) a montré que des pré-adipocytes murins (3T3-L1) incubés 8 jours en présence d'un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale (l'antimycine A ou AA) accumulent de multiples petites vésicules de triglycérides dans le cytosol (figure 1.34). Ce phénotype particulier des pré-adipocytes, induit par une inhibition des phosphorylations oxydatives mitochondriales, révèle bien une perturbation du métabolisme lipidique. Nous nous intéressons donc au laboratoire aux voies de signalisation et à la modification de l'expression génique qui mènent à l'accumulation de triglycérides dans des pré-adipocytes soumis à une inhibition de la chaîne respiratoire. Le phénotype particulier des pré-adipocytes induit par un traitement en présence d'AA est différent du phénotype des adipocytes différenciés caractérisés par de grosses vésicules de triglycérides cytosoliques (figure 1.34). En conséquence, la différenciation adipocytaire des 3T3-L1 induite par un cocktail pro-adipogène constitue notre modèle de référence dans l'étude des mécanismes qui induisent l'accumulation de triglycérides dans des adipocytes soumis à une inhibition de la chaîne respiratoire.

Les travaux de Reusch montrent que le facteur de transcription CREB est un régulateur primaire de l'adipogenèse des 3T3-L1. En effet, des pré-adipocytes transfectés avec un plasmide codant une forme constitutivement active de CREB (VP16-CREB) présentent une accumulation de vésicules de triglycérides révélée par une coloration à l'Oil Red O en l'absence du cocktail pro-adipogène. Par contre, les pré-adipocytes qui surexpriment un dominant négatif de CREB (K-CREB), qui séquestre la protéine endogène et l'empêche de se lier aux séquences CRE, ne se différencient plus en présence d'un cocktail pro-adipogène (Reusch, Colton et al. 2000).

Des travaux menés au laboratoire ont montré que le facteur de transcription CREB est activé suite à la phosphorylation de la Ser133 dans plusieurs types cellulaires présentant un dysfonctionnement mitochondrial (Arnould, Vankoningsloo et al. 2002). S. Vankoningsloo (thèse en cours) a également montré une activation précoce de CREB dans les pré-adipocytes 3T3-L1 incubés en présence d'AA pendant 24 h (figure 1.35) en transfectant les cellules avec un système rapporteur contenant le gène codant la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique de l' $\alpha$ -inhibine activé par ce facteur. En effet, le promoteur de l' $\alpha$ -inhibine a la particularité de posséder quatre séquences consensus CRE. On constate une augmentation de l'activité luciférase dans les pré-adipocytes incubés pendant 24 h en présence de l'inhibiteur. Ce résultat a également été confirmé par le marquage en immunofluorescence de la forme phosphorylée de CREB, 48 h après le début du traitement à l'AA (figure 1.35).

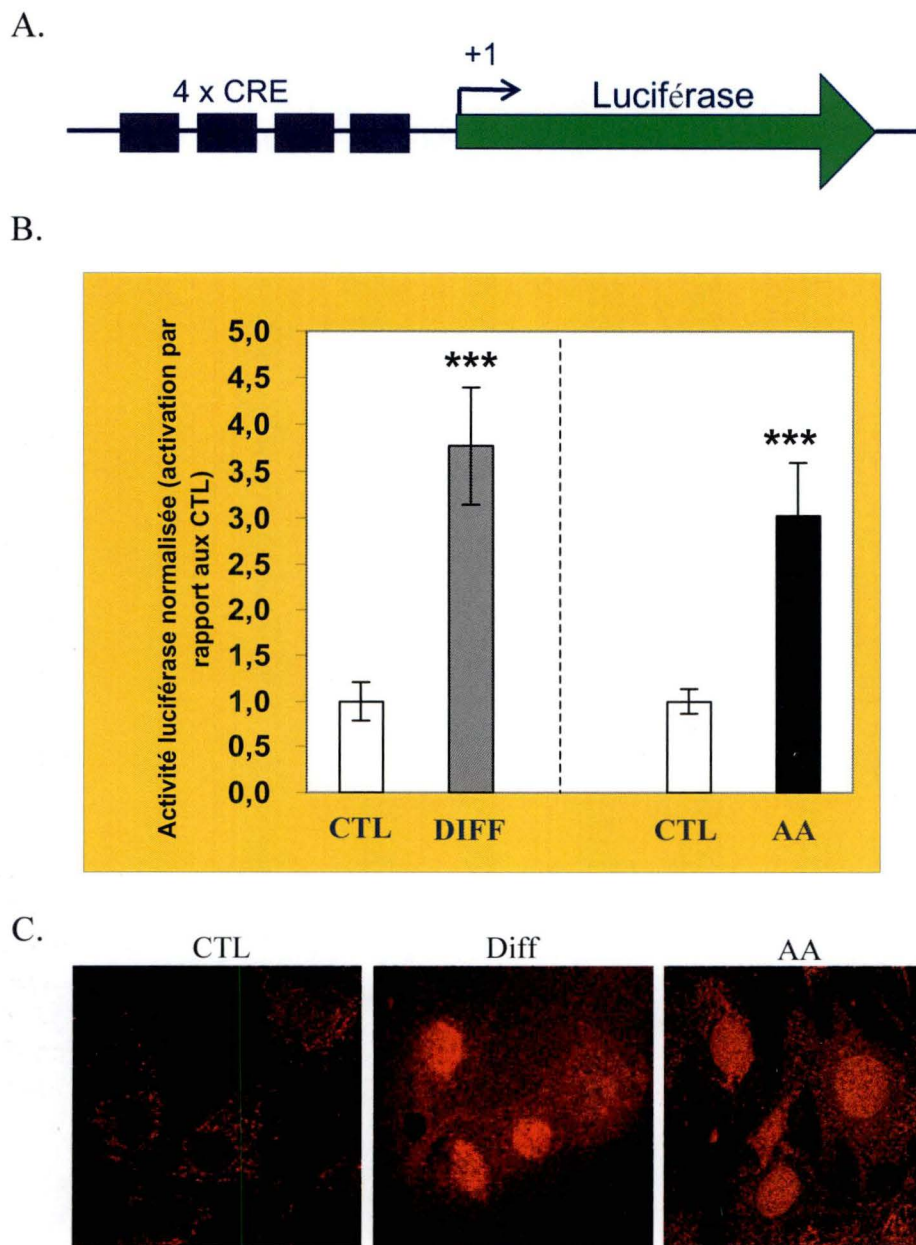


Figure 1.35. Activation du facteur de transcription CREB dans des pré-adipocytes 3T3-L1 incubés en présence du cocktail pro-adipogène (Diff) ou de l'antimycine A (AA). La figure B illustre les activités de la luciférase obtenues après la co-transfection de 3T3-L1 avec un plasmide rapporteur contenant un gène codant la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique de l' $\alpha$ -inhibine contenant 4 séquences consensus CRE et un plasmide d'expression codant la  $\beta$ -galactosidase (A), suivie d'une incubation de 24 h en présence du cocktail pro-adipogène ou de l'antimycine A. Des marquages en immunofluorescence de la forme phosphorylée de CREB sur la Ser133 et des observations en microscope confocale (C) réalisés sur des cellules incubées pendant 48 h en présence d'AA ont permis de confirmer la phosphorylation précoce de la protéine CREB dans les pré-adipocytes 3T3-L1 incubés dans ces conditions.



## 2 Objectifs et stratégies

Etant donné l'importance suspectée de CREB dans l'apparition du phénotype adipocytaire et son activation précoce lors d'un dysfonctionnement mitochondrial, nous avons recherché le rôle éventuel de ce facteur dans l'accumulation de triglycérides induite par une inhibition des phosphorylations oxydatives dans les pré-adipocytes 3T3-L1.

Afin de mettre en évidence le rôle de CREB dans la réponse adaptative des pré-adipocytes à l'inhibition de l'activité respiratoire des mitochondries, nous nous sommes intéressés aux changements d'expression de gènes dans des cellules incubées en présence d'AA et nous avons comparé ces changements à l'expression différentielle des gènes lors du processus de différenciation adipocytaire. Nous avons ensuite recherché le rôle joué par CREB dans les changements d'expression génique et les modifications phénotypiques des pré-adipocytes incubés en présence d'AA en inhibant son expression à l'aide de siRNA.

Les analyses de l'expression génique différentielle dans les modèles d'inhibition mitochondriale et d'adipogenèse ont été réalisées à l'aide d'un microdamier à ADN de faible densité, l'« adipochip ». Afin d'obtenir des informations sur les cinétiques des changements d'expression génique, des hybridations ont été réalisées avec de l'ADNc généré à partir de cellules 3T3-L1 incubées 1, 2, 4, 6 et 8 jours en présence de l'inhibiteur ou du cocktail pro-adipogène.

Pour rechercher le rôle potentiel de CREB dans l'accumulation de triglycérides induite par une inhibition des phosphorylations oxydatives et son rôle éventuel dans les modifications d'expression de gènes dans ces conditions, nous avons utilisé des siRNA pour inhiber l'expression de ce facteur. Pour ce faire, nous avons préalablement déterminé une séquence siRNA qui permet une inhibition importante de l'expression de CREB et nous avons mis au point les conditions de transfection des cellules avec les siRNA permettant d'obtenir une inhibition maximale de l'expression de CREB. Les siRNA ont été utilisés d'une part pour analyser l'expression différentielle de gènes après 4 jours d'incubation en présence d'AA et d'autre part pour rechercher une éventuelle contribution de CREB dans la modification du phénotype des pré-adipocytes soumis à une inhibition de l'activité respiratoire mitochondriale.



# Matériel et méthodes



<b>siRNA(1)</b>	5' ACAUACCAGAUCCGCACAG dT dT 3' 3' dT dT UGU AUGGUCUAGGCGUGUC 5'
<b>siRNA(2)</b>	5' CAUCAUCUGCUCCACUGU dT dT 3' 3' dT dT GUAGUAGACGAGGGUGACA 5'
<b>siRNA(3)</b>	5' UACAGCUGGCUAACAAUGG dT dT 3' 3' dT dT AUGUCGACCGAUUGUUACC 5'

Tableau 2.1. Séquences des siRNA doubles brins utilisés pour inhiber l'expression de CREB.

## Matériel et Méthodes

### 1 Type cellulaire utilisé

Les cellules utilisées dans les différentes expériences de ce travail sont des pré-adipocytes d'embryons murins 3T3-L1 provenant de l'ATCC (*American Tissue and Cell Collection*, USA).

### 2 Culture et sous-cultures des pré-adipocytes 3T3-L1

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, USA). Lorsque le tapis cellulaire atteint la confluence, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont rincées une fois avec 10 ml de solution Phosphate Buffer Saline stérile (PBS) (150 mM NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4) préchauffé à 37°C afin d'éliminer les résidus de sérum, puis détachées avec 2 ml d'une solution de trypsine et d'EDTA (0,5 g/l trypsine; 0,53 mM Ethylène Diamine TétrAcétique) (Gibco BRL, UK). La trypsine est une protéase qui clive les protéines au niveau des acides aminés arginine et lysine. L'EDTA est un chélateur de calcium qui complexe le calcium nécessaire aux cadhérines et aux intégrines impliquées respectivement dans les liens intercellulaires et les interactions entre les cellules et les protéines de la matrice extracellulaire. Le détachement progressif des cellules est suivi au microscope à contraste de phase. La solution de trypsine-EDTA est décantée avant que les cellules ne soient détachées, puis les cellules sont resuspendues dans du milieu de culture DHG (Dubbelco Modified Eagle's Medium-High Glucose, 4,5 g/l de glucose, Gibco BRL, UK) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco BRL, UK) et réparties dans de nouvelles boîtes de culture à une dilution 1:2 ou 1:4. Le sérum, qui contient de nombreux facteurs de croissance et des hormones, est nécessaire à la survie et à la prolifération cellulaire. Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C et dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub> (Heraeus, Allemagne).

### 3 Différenciation des pré-adipocytes murins 3T3-L1 en adipocytes

Le protocole de différenciation des pré-adipocytes utilisé est une adaptation du protocole élaboré par Student et ses collaborateurs (Student, Hsu et al. 1980). Les cellules sontensemencées à 50 % de confluence 3 jours avant le début du programme. Lorsqu'elles sont confluentes, elles sont incubées pendant 48 h en présence du cocktail hormonal de différenciation adipocytaire. Ce cocktail pro-adipogène contient de l'insuline (5 µg/ml), de la dexaméthasone (1 µM) et du dibutyryl-AMPc (db-AMPc) (300 µM) dilués dans le milieu DHG-L1 (DHG avec 1,5 g/l NaHCO<sub>3</sub>) contenant 10 % de SVF. Aux jours 2, 4 et 6 du traitement, le milieu de culture est renouvelé, et seule l'insuline est rajoutée à la concentration de 5 µg/ml. Après 8 jours d'incubation, les pré-adipocytes sont différenciés en adipocytes gorgés de vésicules de triglycérides.

Les cellules contrôles consistent en des pré-adipocytes incubés dans du milieu DHG-L1 contenant 10 % de SVF. Le milieu est également renouvelé tous les 2 jours.



Techniques utilisées pour analyser l'effet du siRNA	Format des boîtes de culture	[siRNA] stock	Quantité de siRNA/puits ou boîte de culture	Volume de siRNA dilué dans du milieu sans sérum	Quantité de jetSI dilué dans du milieu sans sérum	Volume de milieu sans sérum par puits	[siRNA] finale	Volume final de milieu contenant 10 % de sérum
Test à l'Oil Red O	24 puits	20 $\mu$ M	0,7 $\mu$ g	50 $\mu$ l	2,1 $\mu$ l	500 $\mu$ l	100 nM	500 $\mu$ l
Western blotting	6 puits	20 $\mu$ M	2,8 $\mu$ g	100 $\mu$ l	8,4 $\mu$ l	2000 $\mu$ l	100 nM	2000 $\mu$ l
Microdamier	75 cm <sup>2</sup>	20 $\mu$ M	21,12 $\mu$ g	800 $\mu$ l	63 $\mu$ l	16 ml	100 nM	32 ml

Tableau 2.2. Tableau illustrant les quantités de siRNA en  $\mu$ g et les volumes de jetSI<sup>TM</sup> et de milieu DHG avec ou sans sérum en  $\mu$ l ou ml nécessaires pour transfecter des cellules au jetSI<sup>TM</sup> avec le siRNA à une concentration finale de 100 nM (à partir d'une concentration stock de 20  $\mu$ M) dans des boîtes de 24 puits, 6 puits et de 75 cm<sub>2</sub> (d'après le protocole de Eurogentec, Belgique), les formats des boîtes de culture étant choisis en fonction des techniques utilisées pour analyser l'effet de siRNA sur l'expression de CREB.

## 4 Incubation des pré-adipocytes murins en présence d'antimycine A, un inhibiteur des phosphorylations oxydatives

Le modèle d'inhibition de l'activité respiratoire des mitochondries dans les 3T3-L1 en présence d'AA a été mis au point par S. Vankoningsloo dans le cadre de sa thèse (thèse en cours). Le protocole présente un certain parallélisme avec le protocole utilisé pour la différenciation. En effet, les cellules sontensemencées à 50 % de confluence 3 jours avant le début du programme (jour - 3). Les cellules confluentes sont alors incubées en présence d'antimycine A à 10 nM (Sigma, USA), préparée à partir d'une solution stock à 1 mM dans l'éthanol 100 % et diluée à 10 nM dans du milieu DHG-L1 contenant 10 % de SVF. Le milieu de culture est ensuite renouvelé tous les deux jours par du milieu DHG-L1 + 10 % SVF contenant l'antimycine A à la même concentration, et le programme d'inhibition de l'activité mitochondriale des 3T3-L1 dure au maximum 8 jours.

Les cellules contrôles consistent en des pré-adipocytes incubés dans du milieu DHG-L1 contenant 10 % de SVF, le milieu étant également renouvelé tous les 2 jours.

## 5 Inhibition de l'expression génique de CREB par les siRNA

Dans ce travail, nous avons utilisé des siRNA (*small interfering RNA*) pour inhiber l'expression de la protéine CREB dans des cellules transitoirement transfectées. Pour ce faire, trois séquences de 21 nucléotides correspondant à un fragment du transcrit de CREB (Genbank, NM133828) (tableau 2.1) ont été dessinées et synthétisées par la firme Eurogentec (Seraing, Belgique).

Deux techniques de transfection des cellules ont été utilisées : la transfection par électroporation et la transfection par la formation de complexes siRNA-jetSI<sup>TM</sup>. L'efficacité des séquences siRNA(1), (2) et (3) sur l'expression de CREB a été analysée par un Western blotting réalisé sur des lysats de cellules transfectées par électroporation avec les siRNA après 24 h et 48 h. Le taux de transfection des cellules avec les siRNA(1), (2) et (3) par le jetSI<sup>TM</sup>, un agent de transfection de type lipide cationique, a été estimé par un marquage préalable des siRNA à la fluorescéine et une visualisation au microscope confocal des siRNA marqués à la fluorescéine incorporés par les cellules après 24 h et 48 h de transfection.

### 5.1 Transfection des cellules avec les siRNA par la technique d'électroporation

#### 5.1.1 Principe

La technique de transfection des 3T3-L1 avec les siRNA par électroporation consiste à faire entrer des siRNA à l'intérieur des cellules en soumettant les cellules à des chocs électriques. Les membranes cellulaires sont déstabilisées par la formation transitoire de pores dans la membrane plasmique.

#### 5.1.2 Matériel et méthode

Les cellules sontensemencées au jour -3 dans 4 boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup>. Les cellules confluentes sont trypsinisées puis resuspendues dans 5 ml de milieu DHG contenant 10 % de SVF et comptées dans une chambre de Neubauer. Un nombre adéquat de cellules (300000 cellules/test) est centrifugé pendant 10 min à 1000 rpm (rotation par minute). Le



surnageant est décanté et le culot de cellules est resuspendu dans une solution R de transfection (100 µl/test) (Amaya, NL), puis les siRNA sont ajoutés à une concentration finale de 100 nM. Les cellules sont alors soumises à l'électroporation (programme U24 du Nucleofector, Amaya, NL). Après électroporation, les cellules sont diluées dans 500 µl/test de milieu DHG contenant 10 % de SVF et réparties dans des boîtes de culture à 6 puits (Corning, USA). Les cellules sont incubées pendant 4 h à l'étuve à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Après l'incubation, le milieu de culture est renouvelé par 15 ml de milieu DHG contenant 10 % de SVF. L'efficacité d'inhibition de l'expression de CREB par ces trois séquences siRNA est analysée par Western blotting à partir de lysats de cellules préparés après 24 h et 48 h de transfection avec les siRNA (voir point 6).

## 5.2 Transfection des cellules avec les siRNA par le jetSITM

### 5.2.1 Principe

Le jetSI<sup>TM</sup> (Eurogentec, Belgique) est un agent de transfection lipidique cationique spécialement optimisé pour la transfection de cellules de mammifères avec des siRNA. Il complexe les siRNA sous forme de particules chargées positivement capables d'interagir avec les protéoglycans anioniques de la membrane cellulaire, et qui entrent dans la cellule par endocytose. Les propriétés du jetSI<sup>TM</sup> empêchent la dégradation des siRNA et favorise leur libération de l'endosome dans le cytosol.

### 5.2.2 Matériel et méthode

Les réactifs nécessaires pour transfecter les cellules avec des siRNA en présence de jetSI<sup>TM</sup> et le protocole de transfection sont fournis par Eurogentec (Belgique). Le tableau 2.2 reprend les quantités de siRNA et les volumes de jetSI<sup>TM</sup> et de milieu DHG avec ou sans sérum utilisés en fonction du format de la boîte de culture, celle-ci étant choisie en fonction de la technique utilisée pour analyser l'effet du siRNA sur l'expression de la protéine CREB.

La quantité de siRNA à transfecter est pour une concentration donnée, fonction des quantités de cellules, et la quantité de jetSI<sup>TM</sup> à ajouter est proportionnelle à la quantité de siRNA à transfecter selon la formule du protocole Eurogentec:

$$(\text{quantité de siRNA en ng}) * 0,003 = X \text{ µl de jetSI}^{\text{TM}}$$

Le volume calculé de jetSI<sup>TM</sup> est dilué dans du milieu DHG sans sérum et la solution est vortexée puis incubée à température ambiante pendant 15 min. Ensuite, la solution de jetSI<sup>TM</sup> est ajoutée en volumes équivalents à la solution contenant les siRNA et le mélange est vortexé à 1200 rpm pendant 10 s, avant d'être incubé pendant 30 min à température ambiante pour permettre la formation des complexes. Au terme de cette incubation, le milieu de culture est renouvelé avec du milieu DHG sans sérum préchauffé à 37°C. Un volume déterminé de la solution contenant les complexes siRNA/jetSI<sup>TM</sup> est alors ajouté aux cellules qui sont incubées pendant 4 h dans l'étuve à 37 °C contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. On ajoute ensuite un volume équivalent de milieu DHG contenant 20 % de SVF. Les cellules transfectées sont incubées dans l'étuve à 37 °C contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

Des cellules contrôles sont traitées de manière similaire et incubées uniquement en présence de jetSI<sup>TM</sup> dilué dans du milieu DHG sans sérum au moment de la transfection.



### 5.3 Marquage des siRNA à la fluorescéine

#### 5.3.1 Principe

Afin d'estimer le taux de transfection des cellules avec les différents siRNA complexés au jetSI<sup>TM</sup> par des observations au microscope confocal, il faut rendre les siRNA visualisables par un marquage préalable.

#### 5.3.2 Matériel et méthode

Les réactifs nécessaires pour préparer la solution de marquage des siRNA sont fournis par Ambion dans le kit *Silencer<sup>TM</sup> siRNA Labeling Kit* (Ambion, UK), qui contient un tampon de marquage 10 fois concentré, de l'eau *RNase-free*, une solution de NaCl à 5 M, le tampon d'hybridation des siRNA 5 fois concentré et l'agent marquant (fluorescéine).

Les siRNA sont marqués en conditions *RNase-free* et stérile. La concentration stock des siRNA est 100  $\mu$ M. Les siRNA sont d'abord dilués 5 fois dans de l'eau *RNase-free* et la solution diluée est vortexée. Ensuite, la solution de marquage est préparée selon les instructions du kit en mélangeant 36,6  $\mu$ l d'eau *RNase-free*, 10  $\mu$ l de tampon d'hybridation, 38,4  $\mu$ l de la solution diluée de siRNA et 15  $\mu$ l de fluorescéine. La solution de marquage est vortexée et incubée pendant 1 h à 37 °C dans l'obscurité. Ensuite, 10  $\mu$ l de NaCl 5 M et 250  $\mu$ l d'éthanol 100 % froid sont ajoutés à la solution. Après une incubation de 45 min à -70 °C, la solution est centrifugée pendant 15 min à 13000 rpm. L'éthanol précipite les siRNA marqués et la fluorescéine non associée aux siRNA est éliminée dans le surnageant décanté. Ensuite, on rince le culot contenant les siRNA avec 175  $\mu$ l d'éthanol 70 % (dilué dans de l'eau *RNase-free*). Le culot est de nouveau sédimenté par une centrifugation de 5 min à 13000 rpm et le surnageant est décanté. Le culot de siRNA marqués est ensuite séché sous hotte à température ambiante pendant 10 min. Les siRNA sont finalement resuspendus dans 38,4  $\mu$ l d'eau *RNase-free*, à une concentration de 20 nM et vortexés 10 sec à 1200 rpm.

### 5.4 Visualisation de la présence de siRNA dans des cellules 3T3-L1

#### 5.4.1 Principe

Les siRNA complémentaires du transcrit de CREB sont marqués à la fluorescéine (comme décrit au point 5.1.3.) et des cellules 3T3-L1 sont transitoirement transfectées avec les siRNA(1), (2) et (3) complexés au jetSI<sup>TM</sup> (comme décrit au point 5.1.2.). Les noyaux sont marqués au To-pro-3 après 24 h et 48 h de transfection puis les cellules sont observées au microscope confocal.

#### 5.4.2 Matériel et méthode

Les pré-adipocytes, ensemencés sur des lamelles couvre-objets à une densité de 200000 cellules par puits dans des boîtes de culture à 24 puits (Corning, USA), sont transfectés avec les siRNA (20 nM) marqués à la fluorescéine et complexés au jetSI<sup>TM</sup>. Puis, les noyaux sont marqués avec un agent intercalant de l'ADN, le To-pro-3 (T-3605, Molecular Probes), après 24 h ou 48 h de transfection. Les cellules sont rincées une fois au PBS préchauffé à 37 °C, puis fixées pendant 10 min dans une solution de paraformaldéhyde 4 % (Merck, Allemagne). Après fixation, les cellules sont rincées deux fois au PBS. Pour chaque condition, 30  $\mu$ l de To-pro-3 dilué 80 fois dans une solution de RNase (2 mg/ml) sont déposés



<b>Western blotting</b>	<i>Technique de transfection</i>	<i>[siRNA] en nM</i>	<i>Temps d'analyse post-transfection</i>	<i>Type de gel</i>
<i>Recherche de l'efficacité des siRNA sur l'expression de CREB</i>	électroporation	100	1 et 2	SDS-PAGE
<i>Recherche de la concentration optimale du siRNA(3) sur l'expression de CREB</i>	jetSI	10, 20, 50 et 100	2	Nu-PAGE
<i>Recherche de la spécificité d'inhibition de CREB par le siRNA(3)</i>	jetSI	100	1	Nu-PAGE
<i>Recherche de la durée d'inhibition de CREB par le siRNA(3)</i>	jetSI	100	1, 3 et 4	Nu-PAGE et SDS-PAGE

Tableau 2.3. Tableau reprenant les différentes expériences de mise au point de l'outil siRNA par l'analyse de l'expression de CREB en Western blotting, en fonction de la technique de transfection des 3T3-L1, de la concentration en siRNA, du temps d'analyse post-transfection et du type de gel.

<b>Western blotting</b>		<b>anticorps primaire</b>		<b>anticorps secondaire</b>	
		nom et origine	dilution	nom et origine	dilution
<i>Recherche de l'efficacité des siRNA sur l'expression de CREB</i>	protéine d'intérêt	Anti-CREB-1 (Rockland)	1000	HRP anti-lapin	2000
	contrôle de charge	Anti-TFIID(TBP)(N-12) (Sanver Tech)	1000	HRP anti-lapin	2000
<i>Recherche de la concentration optimale du siRNA(3) sur l'expression de CREB</i>	protéine d'intérêt	Anti-CREB-1 (Rockland)	1000	HRP anti-lapin	50 000
	contrôle de charge	Anti-TFIID(TBP)(N-12) (Sanver Tech)	500	HRP anti-lapin	50 000
<i>Recherche de la spécificité d'inhibition de CREB par le siRNA(3)</i>	protéine d'intérêt	Anti-CREB/ATF-1-10E9 (nano Tools)	2000	HRP anti-souris	50 000
	contrôle de charge	Anti-TFIID(TBP)(N-12) (Sanver Tech)	1000	HRP anti-lapin	50 000
<i>Recherche de la durée d'inhibition de CREB par le siRNA(3)</i>	protéine d'intérêt	Anti-CREB/ATF-1-10E9 (nano Tools)	2000	HRP anti-souris	50 000
	$\alpha$ -tubuline	Anti- $\alpha$ -tubuline (Sigma, USA)	5000	HRP anti-souris	50 000

Tableau 2.4. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés lors des analyses en Western blotting dans les expériences visant à optimiser les effets des siRNA sur l'expression du facteur de transcription CREB.

dans une chambre humide et les lamelles sont retournées sur la goutte contenant le To-pro-3, afin que le tapis cellulaire soit en contact avec la solution de marquage pour une incubation de 35 min à l'obscurité. Après deux rinçages au PBS, une goutte de Mowiol (Sigma-Aldrich, Allemagne) préchauffée à 56°C est déposée sur les lames porte-objets et les lamelles couvre-objets sont retournées sur les lames pour le montage. Après la polymérisation du Mowiol pendant une nuit à 4 °C, les cellules sont observées au microscope confocal à 647 nm et 661 nm, longueurs d'ondes d'émission respectives de la fluorescéine et du To-pro-3.

## 6 Western blotting sur mini-gels NuPAGE pré-coulés et SDS-PAGE

### 6.1 Principe

La technique semi-quantitative de Western blotting permet d'analyser l'abondance de protéines dans des lysats de cellules. Dans ce travail, nous avons utilisé cette technique dans le cadre de la transfection des 3T3-L1 avec des siRNA complémentaires de l'ARNm de CREB. Des Western blotting ont permis de rechercher l'effet de trois séquences siRNA (siRNA(1), (2) et (3)) sur l'expression de CREB à partir de lysats de cellules préalablement transfectées transitoirement par la technique d'électroporation, de déterminer la concentration optimale des séquences siRNA à transfecter, de rechercher une toxicité éventuelle de l'agent de transfection (jetSI<sup>TM</sup>) et, enfin, de rechercher la durée d'inhibition de l'expression de CREB par les siRNA ainsi que la spécificité d'inhibition (tableau 2.3).

Des lysats clairs ont été préparés. Après quantification des protéines présentes dans les échantillons, les protéines sont dénaturées et chargées négativement en présence de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) ou de LDS (Lithium Dodécyl Sulfate, pour les gels Nu-PAGE). Les échantillons sont ensuite chargés sur un gel soumis à un champ électrique. La migration électrophorétique des protéines se déroule successivement dans deux gels différents. Le premier gel (« *stacking gel* ») concentre les échantillons. Le second gel (« *resolving gel* ») est un gel de séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire en présence de SDS ou de LDS. Les protéines migrent vers la borne positive et la distance de migration dans le second gel est inversement proportionnelle au logarithme de leur poids moléculaire. Après l'étape de migration, les protéines sont transférées sur une membrane. Celle-ci est ensuite incubée en présence d'une solution de lait afin de minimiser la fixation non spécifique des anticorps. La protéine d'intérêt est alors détectée avec un anticorps primaire spécifique reconnu par un anticorps secondaire dirigé contre le fragment Fc de l'anticorps primaire et couplé à la peroxydase HRP. La révélation est réalisée : en présence d'un substrat, la réaction catalysée par la peroxydase émet des photons. Ce système permet de visualiser la masse moléculaire (par comparaison avec un marqueur contenant des protéines de masse moléculaire connue) et l'abondance de la protéine d'intérêt suite à l'exposition de la membrane à un film autoradiographique. Afin de s'assurer que chaque puits du gel a reçu une quantité équivalente de protéines, un contrôle de charge est effectué par la détection d'une protéine dont l'abondance est inchangée dans les conditions expérimentales étudiées.



## 6.2 Matériel et méthode

### 6.2.1 Sous-culture

Des cellules 3T3-L1 ont étéensemencées à 50 % de confluence 24 h avant la transfection dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> ou dans des boîtes multipuits.

### 6.2.2 Transfection des siRNA

Les cellules sont transfectées transitoirement par électroporation ou le jetSI<sup>TM</sup>. Les deux techniques de transfection sont décrites aux paragraphes 5.1.1. et 5.1.2.

Suite à la transfection des cellules avec les siRNA à une concentration finale de 100 nM par la technique d'électroporation, les cellules ont été ré-ensemencées à confluence dans des boîtes de culture à 6 puits.

Lors de la recherche des concentrations optimales de siRNA pour inhiber l'expression de CREB, les cellules ont été transfectées au jetSI<sup>TM</sup> pendant 4 h avec des concentrations croissantes de siRNA(3) (10, 20, 50 et 100 nM). Une toxicité éventuelle de l'agent transfectant a été recherchée en incubant des cellules en présence de quantités équivalentes de jetSI<sup>TM</sup> utilisées pour la transfection des cellules avec les concentrations croissantes de siRNA (1,68 µl, 4,2 µl, 8,4 µl correspondant respectivement aux volumes utilisés pour les concentrations en siRNA de 20, 50 et 100 nM).

Lors de la recherche de la durée d'inhibition et de la spécificité d'inhibition de l'expression de CREB par les siRNA, les cellules ont été transfectées avec le siRNA(3) à une concentration de 100 nM (tableau 2.2).

### 6.2.3 Préparation des échantillons

#### 6.2.3.1 Principe

Les protéines intracellulaires sont récupérées après une lyse des membranes avec un détergent. Toutes les étapes de préparation des lysats se déroulent à 4°C.

#### 6.2.3.2 Matériel et méthode

Des lysats cellulaires sont réalisés 24, 48, 72 et 96 h après la transfection des cellules avec le siRNA, les temps étant fonction des différentes expériences (tableau 2.3).

Au terme des incubations, les cellules sont rincées une fois avec une solution de PBS non stérile. Les tapis cellulaires sont ensuite raclés dans un volume déterminé de tampon de lyse (Tris 20 mM pH 7,4, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1 %) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC, Roche, Allemagne) et d'inhibiteurs de phosphatases (PIB : 25 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 250 mM p-nitrophénylpyrophosphate, 250 mM β-glycérophosphate, 152 mM NaF). Afin de maximiser la lyse cellulaire, les échantillons sont incubés à 4 °C sur un agitateur rotatif pendant 15 min. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4 °C pendant 15 min à 13 000 rpm. Cette étape est nécessaire pour sédimenter les composants cellulaires insolubles dans le tampon de lyse. Le lysat clair est conservé à -70 °C.

Un dosage de protéines par la technique de Bradford (Bradford 1976) est ensuite réalisé. On ajoute 3 µl de l'échantillon, ou 2,5 µl d'un étalon BSA (bovine serum albumin) de concentration connue (2 mg/ml) à 1 ml de colorant de Bradford (Biorad, Allemagne) (Bradford 1976). Deux types de blancs sont également réalisés. D'une part, un blanc étalon constitué de 2,5 µl d'eau et, d'autre part, un blanc test constitué de 3 µl de tampon de lyse dans lequel sont resuspendus les échantillons. On vortexe quelques secondes et on laisse la



réaction se dérouler pendant 5 min. L'absorbance du produit de réaction est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 595 nm. La concentration en protéines de l'échantillon est calculée par rapport à l'étalon selon la formule suivante :

$$Conc_{éch} = \left( \frac{Abs_{éch} - Abs_{blanc\ éch}}{Abs_{étalon} - Abs_{blanc\ étalon}} \right) \times \frac{Vol_{étalon} \times Conc_{étalon}}{Vol_{éch}}$$

avec Conc = concentration, Abs = absorbance, Vol = volume

Des volumes de lysats clairs correspondant à 30 µg ou 40 µg de protéines sont portés à un même volume avec du tampon de lyse puis du tampon SB (*sample buffer*) concentré 5 fois : 0,5 M Tris pH 6,8, 20 % SDS, 20 % glycérol, 20 % β-mercaptoéthanol, 1 % bleu de bromophénol). Les échantillons sont ensuite chauffés à 70°C pendant 15 min pour les gels Nu-PAGE et à 100 °C pendant 5 min pour les gels SDS-PAGE, puis centrifugés à 13000 rpm pendant 30 sec. Les échantillons et, dans une des pistes, 10 µl de l'étalon de poids moléculaire See Blue Plus2 (Invitrogen, USA) sont chargés sur le gel.

#### 6.2.4 Migration des échantillons

Le facteur de transcription CREB ayant un poids moléculaire de 43 kDa, le gel de séparation utilisé pour rechercher son expression est un gel pré-coulé Nu-PAGE MOPS (N-morpholino propane sulfonic acid) constitué de 10 % de Bis-Tris acrylamide ou d'un gel SDS-PAGE également de 10 %. Le gel Nu-PAGE est placé dans une cuve de transfert Novex (Mini Cell, Invitrogen, USA). Le tampon de migration MOPS (NuPAGE MOPS SDS Running, Mini Cell, Invitrogen, USA) est dilué 20 fois dans l'eau, et on ajoute 500 µl d'anti-oxydants (NuPAGE antioxydant, Mini Cell, Invitrogen, USA) aux 200 ml de tampon placés au milieu de la cuve. Le gel SDS-PAGE est coulé entre deux plaques de montage et polymérise pendant 30 min à température ambiante, puis il est placé dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration (0,05 M Tris-base ; 0,3 M glycine et 1 % SDS). La cuve est fermée et les électrodes sont branchées. Les échantillons sont soumis au champ électrique pendant 55 min à voltage constant (200 V) dans le cas du gel Nu-PAGE. Dans le cas du gel SDS-PAGE, les échantillons migrent pendant 45 min à 35 mA dans le gel de concentration puis environ 5 h à 45 mA dans le gel de migration.

#### 6.2.5 Transfert des échantillons sur une membrane de PVDF

Lorsque l'étape de migration est terminée, le gel est démoulé et les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidène difluoride) (Amersham, UK). La méthode de transfert utilisée est un transfert « semi sec » selon un montage dit en « sandwich ». Le gel est placé délicatement sur un papier Whatman imbibé de tampon de transfert constitué pour le gel Nu-PAGE de « Nu PAGE transfert buffer » (Mini Cell, Invitrogen, USA) dilué 20 fois dans de l'eau distillée et contenant des anti-oxydants dilués 500 fois (Invitrogen, USA) et 10 % de méthanol et, dans le cas du gel SDS-PAGE, de 0,5 M Tris-base pH 8,3, 0,76 M glycine, 0,1 % SDS et 15 % de méthanol. La membrane hydrophobe est préalablement incubée dans un bain de méthanol, imbibée de tampon de transfert puis déposée délicatement sur le gel. Un papier Whatman, imbibé de tampon de transfert est alors déposé sur la membrane. De part et d'autre des deux papiers Whatman sont placées deux éponges imbibées de tampon de transfert. Le montage est ensuite placé dans la cuve de



migration et soumis à un voltage constant (30V) pendant 2 h dans le cas du Nu-PAGE et à une intensité de 55 mA pendant 16 h dans le cas du SDS-PAGE.

### 6.2.6 Incubation de la membrane avec les anticorps et révélation

Après le transfert des protéines, la membrane est placée dans une solution de blocage constituée de TBS (*Tris Buffer Saline* : 20 mM Tris pH 7,4, 140 mM NaCl) contenant 0,1 % de Tween-20 (polyéthylène sorbitan monolaurate) (Sigma Chemical, USA) (TBS-T 0,1 %) et 2 % de lait (Amersham, UK). Le Tween-20 est un détergent non ionique qui empêche les interactions non spécifiques entre les protéines et les anticorps. Le lait contient des protéines qui vont bloquer les sites de liaison non spécifiques. La membrane peut être bloquée pendant 2 h à température ambiante ou 16 h à 4°C. Elle est ensuite incubée 1 h (Nu-PAGE) ou 2 h (SDS-PAGE) en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt dilué dans une solution de TBS-T 0,1 % contenant 2 % de lait (SDS-PAGE). Les différents anticorps primaires utilisés dans ce travail et dirigés contre la protéine CREB ou le contrôle de charge TFIID/TBP ou l' $\alpha$ -tubuline, ainsi que les anticorps secondaire anti-IgG de souris ou de lapin, conjugués à la HRP sont présentés au tableau 2.4. Après 3 rinçages successifs de 15 min effectués dans la solution de TBS-T 0,1 % contenant 2 % de lait, la membrane est incubée pendant 30 min (Nu-PAGE) ou 1 h (SDS-PAGE) en présence de l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire et conjugué à l'enzyme Horse Radish Peroxidase (HRP). Après trois rinçages de 15 min dans une solution de TBS-T 0,1 %, l'étape de révélation a lieu.

La méthode de chimioluminescence a été utilisée pour détecter la présence des protéines. Une solution de révélation provenant du kit ECL (*Enhanced Chemiluminescence Advance<sup>TM</sup> Western blotting detection Kit*, Amersham, UK) est versée sur la membrane. Cette solution contient le substrat de la peroxydase ( $H_2O_2$ ) et du luminol. Après 5 min d'incubation, la membrane est placée dans l'obscurité pour permettre aux photons produits par la réaction enzymatique catalysée par la peroxydase d'imprimer un film autoradiographique (Amersham, UK). Le film est ensuite plongé successivement dans une solution de révélation (Ilford Imaging, UK), de l'eau distillée et dans une solution de fixation (Ilford Imaging, UK), puis rincé à l'eau, séché et scanné.

## 7 Coloration des triglycérides à l'Oil Red O

### 7.1 Principe

Le colorant Oil Red O (ORO) présente une affinité pour les graisses neutres et permet de visualiser et de quantifier l'accumulation de triglycérides dans les cellules (Koopman *et al.*, 2001).

### 7.2 Matériel et méthode

Les cellules 3T3-L1 sontensemencées à 50 % de confluence dans des boîtes de culture multipuits à 24 puits (Corning, USA) 3 jours avant les incubations à l'AA. Au jour 0, le tapis cellulaire est confluent et les cellules sont incubées en présence d'antimycine A pendant 8 jours, avec un renouvellement des milieux tous les 2 jours. Les cellules contrôles sont incubées dans du milieu DHG contenant 10 % de sérum SVF également renouvelé tous les 2 jours. Dans certaines conditions, les cellules ont été préalablement transfectées au jetSI<sup>TM</sup> pendant 4 h avec le siRNA(3) à une concentration de 100 nM.

Au jour 8 d'incubation, les cellules sont rincées avec du PBS (1 ml/puits) et fixées pendant 2 min avec de la paraformaldéhyde à 3,7 % (Merck, Allemagne). Les cellules sont







ensuite incubées pendant 30 min en présence de la solution de coloration ORO (0,5 ml/puits). Cette solution est préparée à partir de la solution stock d'Oil Red O diluée à 0,2 % dans de l'isopropanol (Merck, Allemagne) et à partir de dextrine (Sigma, USA) diluée à 1 % dans de l'eau distillée. Les deux solutions sont ensuite mélangées dans un rapport 3/2 (vol/vol), et la solution de coloration obtenue est filtrée sur un filtre 2V (Whatman, UK).

Après 30 min d'incubation en présence du colorant ORO, les cellules sont rincées deux fois avec 1 ml de PBS. Les triglycérides colorés en rouge sont observés et des micrographies sont prises au microscope à contraste de phase pour vérifier l'état des tapis cellulaires. L'absorbance des tapis cellulaires après coloration est ensuite mesurée au spectrophotomètre (Ultramarck, Biorad, Allemagne) à 490 nm. Ces mesures d'absorbance permettent de quantifier l'accumulation des triglycérides dans les cellules et donc d'établir le degré de différenciation des pré-adipocytes. Des blancs sont effectués par la coloration de puits dépourvus de cellules. Les mesures d'absorbance sont exprimées en unités de densité optique (D.O.). De nombreux tests de coloration réalisés au laboratoire ont montré que ces valeurs représentaient une quantification relative fiable de l'accumulation de triglycérides dans les cellules et que les profils comparatifs obtenus sont identiques que l'on rapporte ou non les valeurs d'absorbance aux quantités de protéines ou d'ADN, et donc au nombre de cellules présentes dans les puits.

## 8 Hybridation d'ADNc sur le microdamier « adipochip »

### 8.1 Principe

L'expression génique de pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A et des adipocytes dont la différenciation est induite par le cocktail pro-adipogène, a été analysée à l'aide de l'« adipochip », un microdamier à ADN de faible densité. Ce damier contient 89 sondes de capture et différents contrôles de fixation, d'hybridation et de rétrotranscription. Les 89 sondes de capture et les différents contrôles sont présents en triple exemplaire sur le microdamier « adipochip ». De plus, les sondes sont réparties à différents endroits sur le microdamier, de sorte que l'« adipochip » est, en réalité, constitué de trois « mini- » microdamiers. De plus, l'ensemble du microdamier est réparti en 6 zones.

Les sondes de capture sont des fragments d'ADNc dont un des brins possède une séquence complémentaire à la séquence du transcrit du gène d'intérêt. Ces sondes sont généralement choisies proches de l'extrémité-3' et donc le plus proche possible de la queue poly(A) d'un ARNm. Elles sont générées par PCR à partir de plasmides contenant les ADNc des gènes d'intérêt et sont fixées sur le microdamier à la concentration de 300 nM. Les 89 gènes d'intérêt potentiel à l'origine de la production de ces sondes de capture ont été choisis sur base de leur rôle dans la différenciation adipocytaire et sont donc susceptibles d'être impliqués dans une perturbation du métabolisme lipidique induite par un dysfonctionnement mitochondrial.

Pour pouvoir analyser l'expression génique dans une condition expérimentale particulière et s'assurer de la fiabilité du résultat, nous devons limiter au maximum l'intervention d'artéfacts expérimentaux liés aux techniques utilisées dans cette technologie. Pour cela, différents trappeurs contrôles sont également présents sur le microdamier (figure 2.1).



### 8.1.1 Contrôle de fixation négatif ou « buffer »

Ces contrôles de fixation négatifs fournis par EAT (Eppendorf Array Technology, Belgique) ne sont pas constitués d'une sonde de capture, mais uniquement de la solution de fixation (spotting buffer, EAT, Belgique). Ils permettent de vérifier qu'aucune contamination n'a eu lieu lors de la fixation des sondes de capture sur le microdamier et ne doivent donc jamais être détectés sur le microdamier. Les contrôles de fixation négatifs sont présents à cinq endroits par « mini » microdamier (figure 2.1).

### 8.1.2 Contrôle de fixation positif ou « concentration curve detection »

Les contrôles de fixation positifs (EAT, Belgique) (10 par « mini » microdamier) sont constitués de sondes de capture préalablement multi-biotinylées et fixées sur le support en verre à des concentrations croissantes (0,5 à 300 nM). Par conséquent, ils doivent toujours être détectés sur le microdamier après révélation, et les spots doivent présenter des intensités de fluorescence croissantes.

### 8.1.3 Contrôle d'hybridation négatif

Les contrôles d'hybridation négatifs sont constitués de fragments d'ADN, fixés sur le support en verre, provenant d'espèces éloignées, ne présentant donc aucune homologie avec l'ADN de l'espèce à étudier (F. de Longueville, 2003). Des sondes trappeurs non biotinylées constituant des contrôles d'hybridation négatifs (EAT, Belgique) sont « spottées » à cinq endroits sur le « mini » microdamier. En théorie, ces contrôles négatifs ne s'hybrident jamais à une cible et ne sont donc jamais détectés. Ils constituent le bruit de fond du signal de fluorescence dû à la fixation des sondes trappeurs.

### 8.1.4 Contrôle d'hybridation positif

Le contrôle d'hybridation positif est constitué du fragment d'un gène provenant d'espèces éloignées et ne présentant aucune homologie avec l'ADN des échantillons de l'espèce à étudier (F. de Longueville, 2003). La cible biotinylée du contrôle positif (EAT, Belgique) est ajoutée au moment de l'hybridation. Ces contrôles permettent de vérifier que l'étape d'hybridation s'est bien déroulée. Les signaux de détection doivent idéalement être comparables dans les conditions contrôle et test (F. de Longueville, 2003).

### 8.1.5 Les standards internes

Les standards internes sont des fragments d'ARN générés de manière synthétique à partir d'un clone d'ADN présentant une extrémité-3' poly(A). Ils sont ajoutés avant la rétrotranscription et constituent un contrôle de l'efficacité de la rétrotranscription des ARNm et donc de l'incorporation des nucléotides biotinylés dans les conditions contrôle et test. Afin d'éviter une hybridation interférentielle croisée avec la population d'ADNc, ces fragments d'ARN sont synthétisés à partir de séquences de plantes. Six standards internes différents sont hybridés sur l'*adipochip*, à des concentrations croissantes (0,005 à 10 ng) (EAT, Belgique). Ces standards internes proviennent de séquences de plants de tomate. L'ensemble du



A.

Actin
ARN18S
HSP 60
p110 $\alpha$
Stat 6
TBP

B.

AAAT	GAPDH	NFATC4
ADD1	Gsn	Stat 6
ATRI	p110 $\alpha$	Plin A
actin	HCNP	RXR $\alpha$
CaMKII	Hp	TBP
Collagen	HSP 84	Smad 3
CPT-1I	HSP 86	SPARC
Cst C	ARNr18S	TF
Cyclin D3	I-PK	TGF- $\beta$ 1
eNOS	LPL-1	VEGF A
ER $\alpha$	MMP2	VEGF B
Fabp4	NFATC2	VEGF C

Tableau 2.5. (A) Liste de 6 gènes de maintenance potentiels choisis à partir de la littérature portant sur la différenciation adipocytaire des 3T3-L1. Des hybridations préliminaires d'ADNc générés à partir d'ARN total extrait de pré-adipocytes incubés pendant 2 et 8 jours en présence du cocktail adipogénique ou de l'antimycine A ont permis d'éliminer HSP 60 de la liste des « housekeeping gènes » et d'établir une seconde liste de 36 gènes (B) parmi lesquels certains sont potentiellement « housekeeping gènes » en fonction de la condition expérimentale et du temps d'incubation.

microdamier est divisé en 6 zones ; chaque zone présente deux localisations pour des standards internes de séquence et de concentrations différentes (figure 2.1).

Enfin, pour pouvoir analyser et comparer l'expression de gènes entre des cellules soumises à des conditions expérimentales différentes (dans le cadre de ce travail, des cellules incubées en présence d'un cocktail pro-adipogène ou en présence d'antimycine A à 10 nM) et des cellules contrôles, il est nécessaire de sélectionner des gènes de maintenance dont l'expression reste inchangée.

### 8.1.6 Les gènes de maintenance ou « housekeeping genes »

Par définition, l'expression de gènes de maintenance ne doit pas être modifiée dans les cellules soumises aux conditions expérimentales étudiées par rapport à leur expression dans les cellules contrôles. En effet, l'expression de ces gènes sert de référence pour la normalisation dans le calcul de l'expression différentielle des gènes d'intérêt. Cependant, étant donné les deux conditions expérimentales étudiées dans ce travail, la différenciation adipocytaire et le traitement à l'antimycine A, et le fait que des cinétiques d'expression de gènes ont été établies dans ces deux conditions (analyse de l'expression génique réalisées après 1, 2, 4, 6 et 8 jours d'incubation en présence du cocktail pro-adipogène ou de l'antimycine A), il est hautement improbable que des gènes aient une expression constante dans les deux conditions expérimentales et/ou au cours du temps. Néanmoins, lors du développement du microdamier « adipochip », 6 gènes, décrits dans la littérature comme étant des gènes dont l'expression ne varie pas au cours de la différenciation des pré-adipocytes, ont été fixés sur le microdamier (tableau 2.5. (A)). Les analyses préliminaires de l'expression génique différentielle dans des cellules incubées pendant 2 et 8 jours en présence du cocktail adipogénique ou de l'antimycine A par rapport à leur expression dans des cellules contrôles ont permis d'éliminer HSP 60 (*Heat Shock Protein 60*) de la liste des *housekeeping genes*. Ces premières analyses ont également permis d'établir une liste de 36 gènes pour lesquels le niveau d'expression (estimé sur base de l'abondance des transcrits) était susceptible d'être constant dans l'une ou l'autre condition expérimentale par rapport à la condition contrôle et ce pour un temps donné (tableau 2.5. (B)). Ainsi, le microdamier « adipochip » présente la particularité que les gènes de maintenance choisis peuvent varier en fonction de la condition expérimentale étudiée et du temps considéré.

Pour pouvoir quantifier l'expression différentielle de gènes, plusieurs étapes préalables sont nécessaires pour récupérer le matériel biologique de départ (l'ARN total) à partir duquel les ARNm seront rétrotranscrits pour permettre la détection post-hybridation des ADNc cibles aux sondes trappeurs. Nous allons maintenant décrire successivement les étapes d'extraction d'ARN total, de rétrotranscription, d'hybridation, de révélation, et les calculs de quantification et de normalisation de l'expression différentielle (figure 2.2).

## 8.2 Matériel et méthode

Les cellules ensemencées dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> et confluentes sont incubées en présence d'antimycine A à 10 nM ou du cocktail hormonal pro-adipogène pendant 1, 2, 4, 6 ou 8 jours. Au terme des incubations, l'ARN total est extrait des cellules, quantifié et son intégrité est contrôlée. Les ARNm sont alors rétrotranscrits en ADNc qui sont hybridés sur le microdamier « adipochip ». L'abondance des hybrides est détectée par un anticorps anti-biotine couplé à la cyanine-3 et l'intensité de fluorescence est mesurée par un scanner confocal. Enfin, l'intensité des spots, qui dans une zone de linéarité est



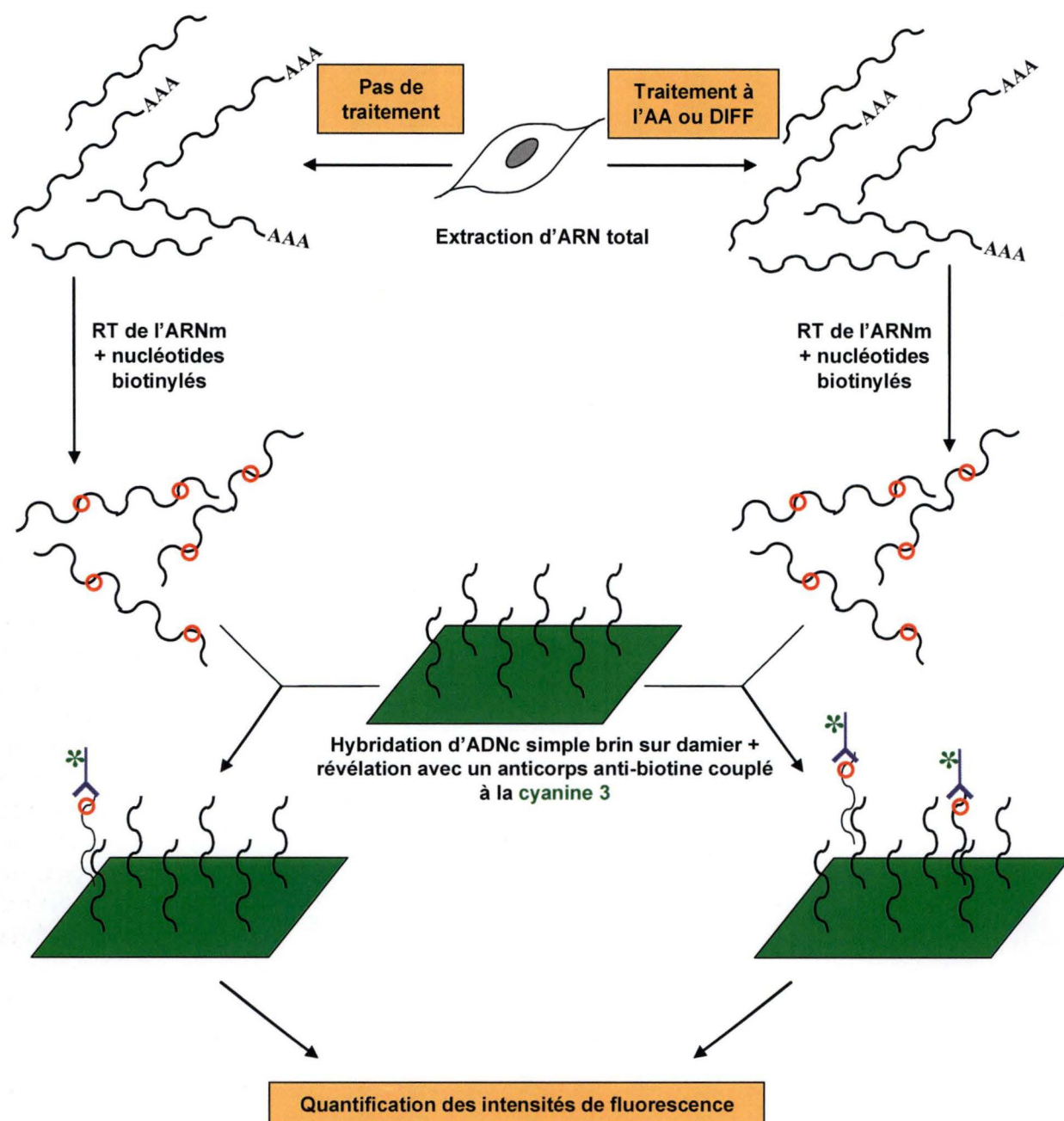


Figure 2.2. Schéma illustrant la succession d'étapes nécessaires à une hybridation sur le microdamier à ADN : extraction d'ARN total, rétrotranscription des ARNm et marquage à la biotine, hybridation et révélation à l'aide d'un anticorps anti-biotine couplé à la cyanine-3, permettant une quantification de la fluorescence et une normalisation de l'expression des gènes analysables par le microdamier avec le cocktail pro-adipogène (Diff) ou avec l'antimycine A (AA).

proportionnelle à l'abondance des transcrits de départ, est quantifiée et l'expression génique est normalisée.

### 8.3 Extraction d'ARN total

Les extractions d'ARN total sont réalisées avec le kit *RNAgents Total RNA Isolation System* (Promega, USA) et se déroulent dans des conditions *RNase-free*. Les volumes des différentes solutions varient en fonction de la densité cellulaire selon un protocole fourni par Promega.

Au terme des incubations avec l'antimycine A ou le cocktail adipogénique, les cellules sont rincées une fois avec une solution de PBS stérile à 4°C, puis raclées et lysées dans une solution dénaturante contenant des sels et du détergent. Les lysats cellulaires sont récupérés dans des tubes de 15 ml, et successivement vortexés, passés à la seringue et à nouveau vortexés afin d'homogénéiser la solution et d'assurer une lyse efficace des cellules et de l'ADN génomique. On ajoute alors de l'acétate de sodium à 2 M (pH 4,0) et de l'alcool Isoamyl : Chloroforme : Phenol (Promega, USA). Cette dernière solution permet de séparer les phases aqueuse et organique. La suspension est ensuite mélangée par inversion et vortexée vigoureusement pendant 10 s, puis elle est incubée sur glace pendant 15 min. La suspension est ensuite transférée dans un tube COREX de 15 ml et centrifugée à 4°C et 10 000 G pendant 30 min. Suite à cette centrifugation, une phase aqueuse contenant l'ARN total et une phase organique contenant les protéines précipitées sont visibles. L'ADN génomique est présent à l'interface. La phase aqueuse est décantée délicatement et transférée dans un nouveau tube COREX. Le volume récupéré est mesuré et un volume identique d'isopropanol est ajouté. La solution est mélangée et incubée à -20 °C pendant 15 min afin de précipiter l'ARN total, avant d'être centrifugée pendant 10 min à 10000 g (4 °C). Le surnageant est décanté et le culot d'ARN total est lavé par une solution d'éthanol 75 % (4 °C). Après une troisième centrifugation pendant 10 min à 10.000 g (4 °C), l'éthanol est décanté et le culot d'ARN total est séché à température ambiante pendant 30 min. L'ARN total est ensuite resuspendu dans de l'eau *RNase-free* (Promega, USA), l'absorbance est lue à 260 nm et l'ARN total extrait est quantifié au GeneQuant. La qualité de l'ARN total récupéré est également déterminée par une électrophorèse capillaire de l'ARN sur un système Bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies). On obtient ainsi un profil d'ARN total qui reflète son intégrité. Le rapport ARNr28S/ARNr18S reflète la qualité de l'ARN. L'ARN total est aliquoté et conservé à -70 °C.

#### 8.3.1 Rétrotranscription des ARNm en ADNc

Une rétrotranscription des ARNm en ADNc est nécessaire pour réaliser une hybridation ultérieure sur le microdamier « adipochip ». La rétrotranscription a lieu dans des conditions *RNase-free*.

En fonction de la concentration en ARN total de l'échantillon obtenu après extraction, un volume est prélevé afin de rétrotranscrire les ARNm contenus dans 20 µg d'ARN total et d'hybrider la quantité équivalente d'ADNc. Le volume d'ARN total prélevé est centrifugé sous vide afin d'évaporer l'eau et de concentrer l'échantillon. Un volume de 2 µl d'une solution contenant les 6 standards internes (EAT, Belgique) à différentes concentrations est ajouté, ainsi que 2 µl d'oligo-dT (500 ng/µl, Invitrogen, USA) et 5,5 µl d'eau *RNase-free* (Promega, USA). Le volume total de réaction est de 9,5 µl et le mélange est incubé pendant 10 min à 70°C afin que l'oligo-dT s'hybride sur la queue poly(A) des ARNm. La solution est ensuite placée sur glace pendant 5 min. Un « mix de réaction » est alors ajouté à la solution d'ARN. Ce « mix de réaction » est composé de 4 µl de tampon RT 5x (Invitrogen, USA), 2 µl



de DTT (0,1 M, Invitrogen, USA), 1 µl de RNAsine (40 U/µl, Promega, USA) et 2 µl d'un mélange de dNTP. Le mélange de dNTP est préalablement préparé à partir de différents dNTP (dATP 100 mM, dTTP 100 mM, dGTP 100 mM, dCTP 16 mM) (Roche) et dCTP biotinylés 1 mM (Perkin Elmer). La solution obtenue est mélangée et incubée à température ambiante pendant 5 min. Ensuite, 1,5 µl de transcriptase inverse Superscript RII (200 U/µl, Invitrogen) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est incubé à 42°C pendant 90 min afin de rétrotranscrire les ARNm en ADNc biotinylés. L'ajout de Superscript RII et l'incubation à 42°C est répétée afin d'assurer une efficacité plus grande de la rétrotranscription. Ensuite le mélange réactionnel est incubé pendant 15 min à 70 °C. On ajoute enfin 1 µl de RNaseH (2 U/µl, Invitrogen, USA) afin de dégrader les ARNm hybridés à l'ADNc et les ARN non rétrotranscrits et doubles brins (ARNt et ARNr). La mixture est alors incubée pendant 20 min à 37 °C, et l'ADNc est dénaturé par une incubation à 95°C pendant 3 min. L'ADNc est conservé à -20 °C.

### 8.3.2 Hybridation sur le microdamier adipochip

L'hybridation se déroule dans des chambres d'hybridation Eppendorf (EAT, Belgique). La solution d'hybridation est constituée des tampons *hybribuffer* A (10 µl/chambre) (EAT, Belgique) et *hybribuffer* B (40 µl/chambre) (EAT, Belgique), d'ADNc (20 µl/chambre) (EAT, Belgique), du contrôle positif d'hybridation biotinylé, C4I (10 µl/chambre) (Eurogentec), et d'eau dépourvue de RNases (20 µl/chambre). Cette solution est préparée sous hotte puis chauffée dans un four à 60 °C pendant une minute afin que le SDS présent dans l'*hybribuffer* B ne précipite pas. Ensuite, la solution est délicatement déposée sur le microdamier. Pour l'hybridation, la lame contenant le damier est déposée dans un thermomixer et incubée une nuit à 60 °C. La chambre d'hybridation (EAT, Belgique) est ensuite retirée délicatement et la lame est immergée dans une solution de lavage (*washing buffer*) contenant 0,1% de tween-20 et 2,5 % de la solution Unibuffer (EAT, Belgique) afin de retirer l'excédent de la solution d'hybridation. Après 4 lavages de 2 min effectués à température ambiante, la lame est renversée sur 800 µl de solution de tampon de blocage (11 mg de lait Gloria (Nestlé) dans une solution Unibuffer diluée 4 fois) contenant l'anticorps anti-biotine conjugué à la cyanine 3 (Lucron) dilué 1000 fois. L'agent bloquant est utilisé pour masquer les sites de liaisons non spécifiques de l'anticorps anti-biotine. Le damier est incubé à l'obscurité en présence de l'anticorps pendant 45 min. Après 5 lavages de 2 min réalisés à température ambiante avec un tampon de lavage, et 2 lavages de 2 min à l'eau distillée, afin d'éliminer l'excédent d'anticorps et les sels du tampon de lavage qui augmenteraient le bruit de fond lors de la lecture du microdamier au scanner, la lame est séchée par une centrifugation (centrifugeuse Centra CL3R) de 5 min à 600 rpm et à 20°C. L'abondance des ADNc hybridés sur les sondes de capture est détectée par la mesure des intensités de fluorescence des spots à l'aide d'un scanner confocal.

### 8.3.3 Quantification et normalisation de l'expression génique

La cyanine-3 est un fluorochrome excité à 550 nm et qui émet de la lumière à 570 nm. L'intensité des spots révèle la proportion d'anticorps anti-biotine conjugués à la cyanine-3 fixés sur l'ADNc biotinylé et hybridé sur son fragment complémentaire. L'intensité des spots est donc proportionnelle à la quantité d'ARNm présents dans la cellule à un moment donné. Par conséquent, une quantification de l'intensité des spots préalable à la normalisation de l'expression génique est nécessaire.

La lame est scannée à 3 gains de sensibilité différents (100, 70 et 50) à l'aide du programme *ScanArray Express* (Perkin Elmer) et les images obtenues sont enregistrées dans

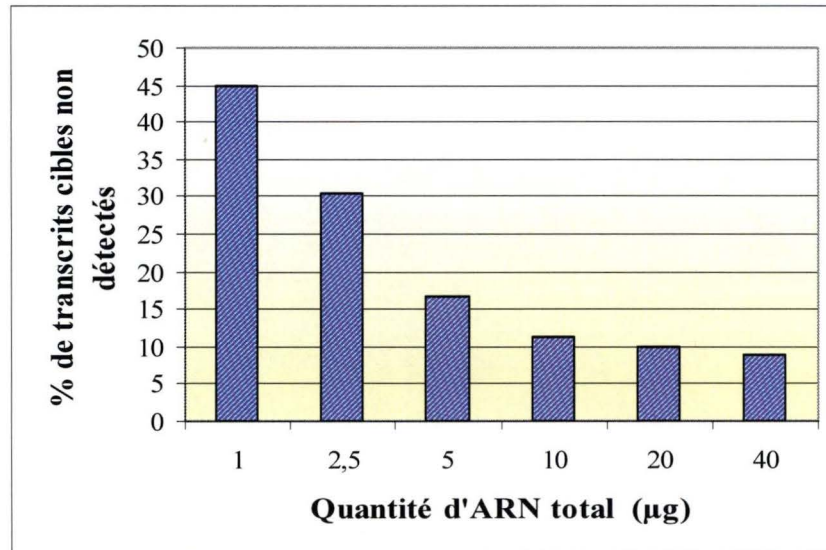


Figure 2.3. Graphique représentant les pourcentages de transcrits cibles non détectés sur le microdamier « adipochip » en fonction de la quantité d'ARN total engagée pour la rétrotranscription qui précède l'étape d'hybridation.



un format TIFF 16 bits. Le gain 100 permet de détecter les transcrits de gènes faiblement « exprimés », et donc non visibles au gain 70 ou 50 ; les gains 70 et 50 permettent de quantifier les gènes dont les transcrits abondants génèrent des intensités de fluorescence saturées au gain supérieur.

A chaque gain, une moyenne de la somme des pixels constituant chaque spot est réalisée par le programme *Imagen 4.2* (Biodiscovery). Pour chaque spot, la moyenne de l'intensité du bruit de fond localisé autour du spot est déduite de la moyenne d'intensité de ce spot.

Les valeurs d'intensité ainsi quantifiées sont normalisées par le programme *Data Processing Software for EatChips* (EAT, Belgique). Le calcul de normalisation de l'expression génique prend en compte les contrôles d'hybridation négatifs, les standards internes et les gènes dont l'expression est constante pour la condition expérimentale. Dans un premier temps, une moyenne des intensités des contrôles d'hybridation négatifs est réalisée à chaque gain, et déduite de l'intensité de chaque spot dans les conditions test et contrôle. Ensuite, l'intensité de chaque spot dans la condition test est divisée par l'intensité du spot correspondant dans la condition contrôle. La valeur obtenue est un ratio d'intensité et ne comporte pas d'unité. La moyenne des ratios des standards internes de chaque zone est réalisée, et l'intensité de chaque spot d'une zone est divisée par la moyenne des ratios des standards internes de cette zone. Ensuite une sélection des gènes dont l'expression est constante dans la condition test par rapport à la condition contrôle est effectuée parmi la liste des 36 gènes de maintenance potentiels : seuls sont retenus les gènes dont le ratio d'intensité est proche de 1. Plus le nombre de gènes de maintenance est élevé pour une condition donnée, plus les résultats de normalisation de l'expression génique sont fiables. Le programme effectue alors la moyenne des ratios d'intensité des gènes de maintenance retenus et divise l'intensité de chaque spot d'intérêt par cette valeur. Une valeur normalisée de l'expression génique est ainsi obtenue pour chaque spot et à chaque gain.

Parmi ces valeurs, il est indispensable de distinguer les gènes dont l'expression est considérée et annotée comme étant qualitative et ceux pour lesquels l'abondance des transcrits est quantifiable. La notion de « gènes qualitatifs » est attribuée aux gènes dont les transcrits hybridés génèrent au moins une valeur d'intensité non quantifiable. Une valeur non quantifiable est soit saturée, soit non détectée sur le microdamier. Les valeurs numériques attribuées aux gènes qualitatifs constituent uniquement une indication de la surexpression ou de la sous-expression de ces gènes dans la condition test par rapport à la condition contrôle.

#### **8.3.4 Mise au point de la quantité optimale d'ARN total engagée sur le microdamier**

Afin de déterminer la quantité optimale de matériel à hybrider sur l'« adipochip », une expérience préalable a été réalisée au cours de laquelle des quantités croissantes d'ARN total (1 à 40 µg) ont été utilisées pour la rétrotranscription avant hybridation des produits de rétrotranscription (figure 2.3). Nous avons remarqué, comme attendu, que le pourcentage des gènes détectés est fonction de la quantité de matériel à hybrider, le maximum étant obtenu pour 40 µg d'ARN total. Cependant, 40 µg est une quantité trop importante et difficile à obtenir à partir des cellules 3T3-L1 contrôles. Les quantités de 10 et de 20 µg sont possibles d'un point de vue pratique. Nous avons préféré partir de 20 µg d'ARN total dans toutes nos conditions expérimentales car bien que le nombre de transcrits correspondant à des gènes détectables varie peu entre 10 et 20 µg, les intensités de fluorescence sont plus importantes à 20 µg et donnent des résultats d'autant plus fiables (meilleure discrimination entre les signaux et le bruit de fond).

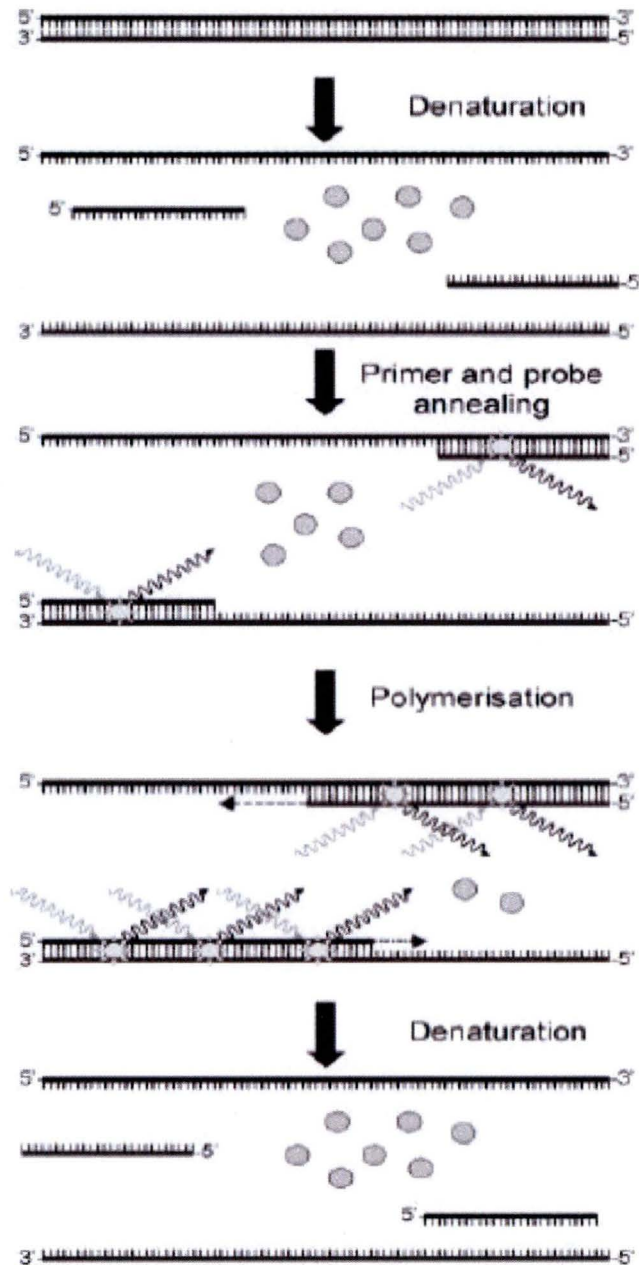


Figure 2.4. Visualisation du mécanisme de quantification de l'accumulation des amplicons générés par PCR en temps réel suite à l'incorporation d'un agent intercalant fluorescent dans l'ADN, le Sybr Green. Au cours de l'étape de dénaturation, la sonde Sybr Green émet peu de fluorescence. Lorsque la température d'hybridation est atteinte, quelques molécules fluorescentes s'intercalent dans les doubles brins formés par l'amorce et la cible. Au cours de l'étape de polymérisation qui suit l'hybridation, un nombre croissant de sondes Sybr Green s'intercalent dans les doubles brins. L'augmentation de la fluorescence, proportionnelle à l'abondance des amplicons, est détectée en temps réel.



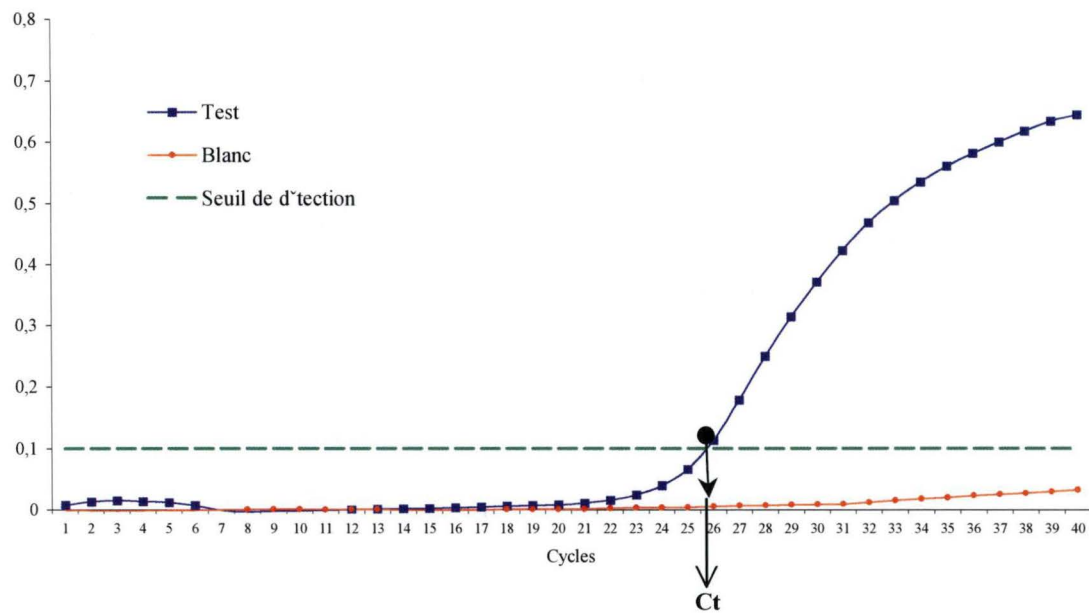


Figure 2.5. Courbe d'amplification théorique obtenue par RT-PCR en temps réel, montrant l'évolution de l'intensité de fluorescence émise par le SYBR Green en fonction du nombre de cycles PCR. Le Ct représente le cycle à partir duquel le signal de fluorescence est significativement supérieur au bruit de fond.

## 9 Real-Time PCR

### 9.1 Principe

La PCR en temps réel (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*) permet d'amplifier de manière exponentielle et spécifique un fragment d'ADN à partir d'un couple d'amorces spécifiques du fragment d'ADN à amplifier (figure 2.4). Il s'agit d'une technique très sensible pour détecter une faible abondance des ARNm cibles rétrotranscrits en ADNc (Bustin, 2000). La quantité d'amplicons produits est directement mesurable par l'intensité de fluorescence d'une molécule, ajoutée au mélange de départ, qui s'intercale dans l'ADN doubles brins (Syber Green) (Elyse Poitras et Alain Houde, 2002). Le signal fluorescent émis par le Syber Green est détecté à partir d'un certain seuil de fluorescence et la fluorescence augmente de manière exponentielle avant d'arriver à un plateau de saturation. Le nombre de cycles à partir duquel le signal d'émission de fluorescence est statistiquement plus élevé que le bruit de fond correspond au Ct (*cycle threshold*) (figure 2.5) (Gibson *et al.*, 1996). Les valeurs de Ct étant inversement proportionnelles à la quantité initiale d'ADNc cible, elles sont utilisées pour calculer l'abondance relative du transcrit d'intérêt dans la condition expérimentale par rapport à la condition de référence, après normalisation des valeurs de Ct par celles du *housekeeping gene* TBP (*TaTa-box binding protein*) dans les deux conditions test et référence.

La PCR en temps réel nous a permis de détecter et de quantifier l'expression relative de gènes pour lesquels les ADNc hybridés donnent une intensité de fluorescence qui n'est jamais détectée sur le microdamier, même avec 40 µg d'ARN total engagé. Cette technique a également été utilisée pour vérifier l'expression différentielle de 4 gènes, Smad 3, mtClic, FAS et CPT-11 dans certaines conditions contrôle et test obtenue sur le microdamier.

### 9.2 Matériel et méthode

#### 9.2.1 Choix des amorces

Les amorces sont choisies à l'aide du programme *Primer Express* (Applied Biosystem) (tableau 2.6). Ce programme permet de choisir les amorces permettant une amplification optimale de l'ADNc par l'appareil ABI Prim 7000. Le choix des amorces (Applied Biosystem, UK) est réalisé sur base de certains critères :

- La longueur optimale du fragment à amplifier doit être de 50 à 150 pb
- La température de *melting* doit être comprise entre 58°C et 60°C
- L'amorce ne doit pas comprendre 4 répétitions d'une même base
- Les 5 derniers nucléotides à l'extrémité 3' de l'amorce doivent comprendre au maximum 2 G et/ou 2 C afin de minimiser l'hybridation entre amorces

#### 9.2.2 Extraction d'ARN total et rétrotranscription des ARNm en ADNc

L'ARN total de pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A ou du cocktail adipogénique est extrait à l'aide du kit *RNAgents Total RNA Isolation System*. La concentration de l'échantillon est déterminée par une mesure de la densité optique à 260 nm.

La rétrotranscription des ARNm en ADNc en vue d'une PCR en temps réel diffère légèrement de la rétrotranscription qui précède une hybridation sur microdamier. En premier lieu, la quantité d'ARN total nécessaire est nettement plus faible du fait de l'amplification des acides nucléiques au cours de la PCR. En outre, aucun standard interne n'est ajouté lors de la



Gènes	Amorces sens	Amorces anti-sens
ATRII	GTC ATT CTC TGC CTG TCC CAT ATT ATA	TTC CCA GAA CTT TGA ATC TAC CTC AT
CaMKIV	CCT CTA CCT GCC TTT CAA ATA AAT ACC	GGT ACA TCA AAG CCT AAT TCT ATC TCA
mtClic	AGA GCC CAC AGC AAG CAT TCT	ATC AGC CGC ATG GAG ACA TC
FAS	GTG AAG AAG TGT CTG GAC TGT GTC AT	TCG CTC ACG TGC AGT TTA ATT G
IL-6	CCT AGT GCG TTA TGC CTA AGC A	TCG TAG AGA ACA ACA TAA GTC AGA TAC CT
Leptine	TGC ATT TAC ATA CCG CAT TTC AG	CCC TAT CCC TTG TCC TAT TGT CA
Smad 3	CCC TGC TGG ATT GAG CTA CAC	ACC CGC TCC CTT TAC TCC TAG T
TBP	CAG TTA CAG GTG GCA GCA TGA	TAG TGC TGC AGG GTG ATT TCA G
TNF- $\alpha$	GAA ACA CAA GAT GCT GGG ACA GT	CAT TCG AGG CTC CAG TGA ATT C
Wnt-10 b	CCT ACT TCC TTT GGA TAG GGA GTC TAT	GAC TCC ACA CAA TGC CTG CTA TT

Tableau 2.6. Tableau présentant les différents gènes dont l'expression a été analysée quantitativement par la technique de la PCR en temps réel et les différentes séquences sens et anti-sens utilisées comme amorces pour la PCR en temps réel.

rétrotranscription de l'ARNm, et le mélange de dNTP (Eurogentec, Belgique) n'est pas biotinylé. Enfin, les temps d'incubation et le mélange réactionnel sont similaires à la rétrotranscription qui précède une hybridation sur microdamier, excepté que l'enzyme SuperScript RII n'est ajoutée qu'une fois lors de la réaction. L'ADNc obtenu est conservé à -20 °C. Les transcrits des gènes codant pour ATRII, CaMKIV et Wnt-10b ont été amplifiés à partir de 4 µg d'ARN total utilisés pour la rétrotranscription et ceux codant pour l'IL-6, la leptine et le TNF-α à partir de 7 µg d'ARN total. Les transcrits des gènes dont l'expression différentielle a été validée par PCR en temps réel ont été amplifiés à partir de 2 µg d'ARN total.

### 9.2.3 L'amplification de l'ADNc par PCR en temps réel

Pour chaque ADNc, un *Master mix* composé du mix SYBR Green I (12,5 µl/tube), d'eau (5,84 µl/tube), d'amorces sens à 9 µM (0,83 µl/tube) et d'amorces anti-sens à 9 µM (0,83 µl/tube) est réalisé. Un volume de 20 µl de cette solution *Master mix* est déposé dans chaque tube, ainsi que 5 µl d'ADNc dilué de 10 à 10000 fois. Le mix SYBR Green I (Applied Biosystems, UK) contient en plus de l'agent intercalant, une enzyme ADN polymérase thermostable et des nucléotides. De plus, l'amplification d'un ADNc provenant du transcrit d'un gène dont l'expression ne varie pas dans nos conditions expérimentales (ADNc de TBP) est réalisée aux dilutions 10, 100, 1000 et 10000 fois dans les conditions contrôle et test. Ces courbes de dilution permettent de vérifier l'efficacité de la PCR dans les deux conditions étudiées.

Chaque tube est fermé et spiné, puis placé dans l'appareil PCR en temps réel (ABI Prim 7000). Le programme *SDS Software* (ABI) permet de détecter la fluorescence émise par le SYBR Green I lorsqu'il s'intercale dans l'ADN double brins.

Enfin, pour s'assurer qu'aucun contaminant n'a été amplifié et détecté par le SYBR Green I, un « blanc » NTC (*No Template Control*) est effectué. Dans cette condition, on remplace les 5 µl d'ADNc par 5 µl d'eau distillée. Un second contrôle, appelé NAC (*No Amplification Control*) est effectué : le tube reçoit 5 µl d'un échantillon d'ARN où l'étape de « rétrotranscription » s'est déroulée en l'absence de SuperScript RII. Par conséquent, le seul ADN qui peut être amplifié lors de la PCR en temps réel est l'ADN génomique éventuellement présent dans l'extrait d'ARN.

### 9.2.4 Analyse des résultats

Les différentes concentrations en ADNc (dilutions 10, 100, 1000 et 10000) ont permis de déterminer une droite de régression pour chaque gène. La pente de ces droites renseigne sur l'efficacité de la PCR : une efficacité optimale est obtenue pour une pente de -3,2, selon la formule :

$$E = 10^{-1/\text{pente}} - 1$$

Seule l'expression des gènes pour lesquels les droites de régression sont parallèles pourra être comparée. Enfin, l'abondance relative des transcrits peut être déterminée, après soustraction des Ct de la condition expérimentale par le Ct de la condition contrôle, par la formule :

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

avec  $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{gène d'intérêt}}) - (\Delta Ct_{\text{TBP}})$ .



## Résultats et discussion



## Résultats et Discussions

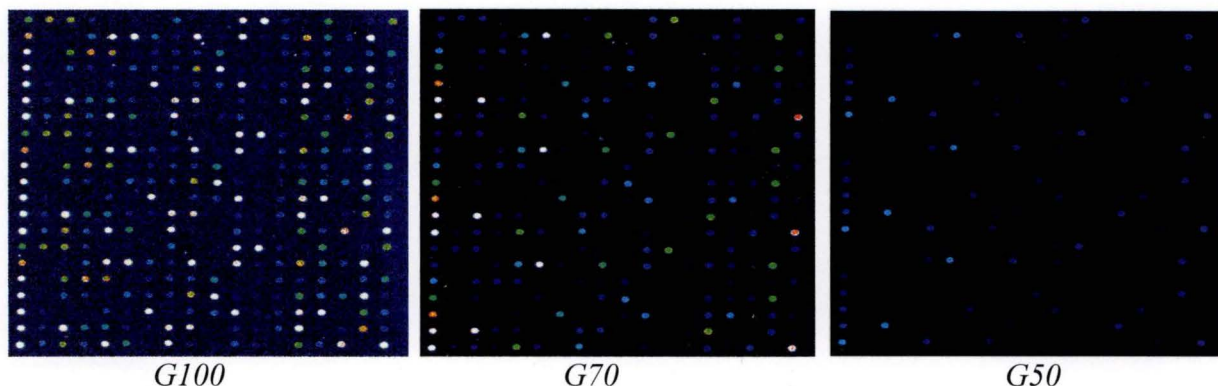
Notre travail s'inscrit dans le cadre de la thèse de S. Vankoningsloo qui porte sur l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires induisant une accumulation de triglycérides sous forme de vésicules cytosoliques dans des pré-adipocytes 3T3-L1 incubés, pendant 8 jours, en présence d'un inhibiteur des phosphorylations oxydatives comme l'antimycine A, et sur la comparaison de ces mécanismes avec ceux qui contribuent à l'accumulation de triglycérides dans le processus de différenciation adipocytaire.

La première partie de ce travail a consisté, d'une part, à comparer les modifications de l'expression de gènes dans des pré-adipocytes incubés pendant 8 jours en présence d'antimycine A et des adipocytes différenciés suite à l'incubation de pré-adipocytes pendant 8 jours avec le cocktail adipogénique. L'expression de 6 gènes pour lesquels les transcrits non jamais été détectés sur le microdamier à ADN a été étudiée par PCR en temps réel. D'autre part, nous avons analysé la cinétique des modifications d'expression de gènes au cours de l'incubation des pré-adipocytes avec l'inhibiteur mitochondrial ou le cocktail pro-adipogène. Une validation des résultats d'hybridation obtenus pour 4 candidats à l'aide du microdamier a été réalisée par PCR en temps réel et clôture cette première partie.

Dans la seconde partie du travail, nous avons recherché le rôle potentiel du facteur de transcription CREB dans l'accumulation des triglycérides induite par une inhibition de la chaîne respiratoire dans les pré-adipocytes 3T3-L1 en inhibant l'expression de ce facteur par le mécanisme RNAi. La recherche d'un siRNA efficace et les conditions optimales de transfection des cellules avec les siRNA ont été préalablement mises au point. Ensuite, une étude fonctionnelle portant sur l'analyse phénotypique caractérisée par l'accumulation de triglycérides a été réalisée sur des pré-adipocytes préalablement transfectés avec un siRNA dirigé contre le transcrit de CREB puis incubés pendant 8 jours avec l'AA. Finalement, afin de rechercher des gènes dont l'expression est potentiellement régulée par CREB, une analyse de l'expression différentielle de gènes au jour 4 du traitement à l'AA a été réalisée à partir de pré-adipocytes préalablement transfectés avec un siRNA capable d'éteindre l'expression de CREB. La modification d'expression génique obtenue dans ces conditions a été comparée au profil d'expression génique obtenu pour des pré-adipocytes incubés pendant 4 jours avec l'inhibiteur mais non transfectés avec le siRNA.

Avant d'exposer et d'analyser nos résultats, nous tenons à préciser que les hybridations n'ont été réalisées qu'une seule fois et que la reproductibilité des résultats de l'« adipochip » n'est pas encore établie dans nos conditions expérimentales. Ces expériences d'hybridation sur l'« adipochip » devront donc être réalisées ultérieurement sur des triples d'extraction, afin de pouvoir calculer une moyenne et de déterminer un écart-type sur les valeurs d'expression génique obtenues et permettre ainsi des analyses statistiques.



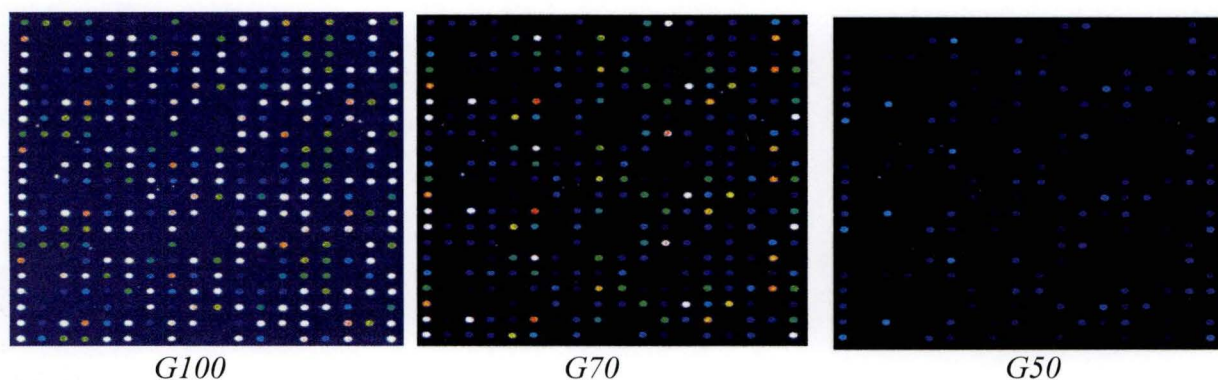


*G100*

*G70*

*G50*

*Contrôle 6 jours*

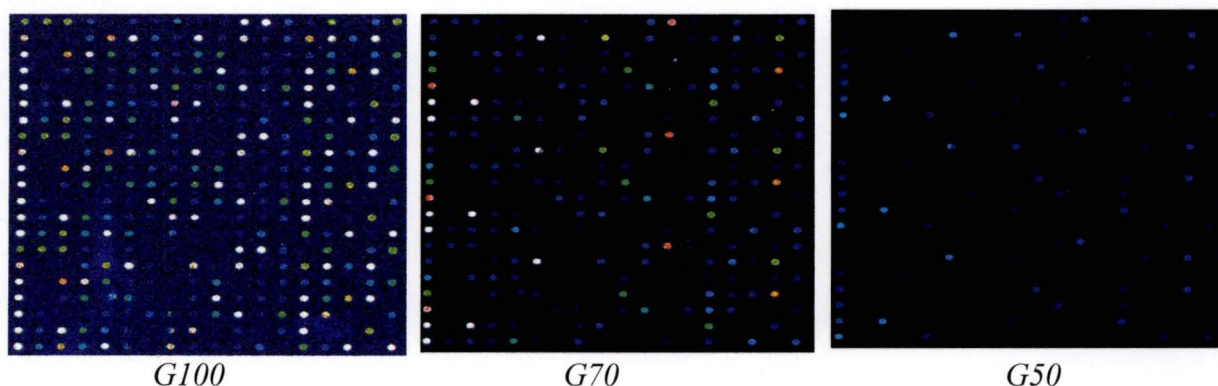


*G100*

*G70*

*G50*

*Différenciation 6 jours*



*G100*

*G70*

*G50*

*AA 6 jours*

Figure 3.1. Images d'acquisition aux gains (G) 100, 70 et 50 des intensités de fluorescence des spots sur le microdamier « adipochip » après des hybridations d'ADNc obtenues par rétrotranscription à partir de 20  $\mu$ g d'ARN total extrait de cellules contrôles ou de cellules incubées pendant 6 jours en présence du cocktail pro-adipogène (Différenciation) ou de l'inhibiteur antimycine A à 10 nM (AA).



# **1 Analyse de l'expression différentielle de gènes dans des pré-adipocytes incubés en présence d'un inhibiteur de la chaîne respiratoire mitochondriale ou d'un cocktail pro-adipogène**

## **1.1 Analyse comparative de l'expression différentielle de gènes dans des pré-adipocytes après 8 jours d'incubation en présence d'antimycine A ou d'un cocktail pro-adipogène**

Il a été montré au laboratoire que les pré-adipocytes 3T3-L1, après une incubation en présence d'un inhibiteur des phosphorylations oxydatives pendant 8 jours, gardent leur forme fibroblastique mais accumulent de multiples petites vésicules de triglycérides dans leur cytosol. Cette modification de leur phénotype suggère une perturbation du métabolisme lipidique induite par l'inhibition de l'activité respiratoire des mitochondries. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents qui entraînent cette accumulation de triglycérides, nous avons choisi d'analyser l'expression différentielle de gènes dans des pré-adipocytes 3T3-L1 incubés pendant 8 jours en présence d'antimycine A et de comparer les changements d'expression de gènes à ceux observés dans des adipocytes différenciés au terme d'une incubation de 8 jours en présence du cocktail adipogénique. En effet, l'adipogenèse *in vitro* de 3T3-L1 constitue notre modèle de référence dans l'étude des mécanismes qui induisent l'accumulation de triglycérides dans des pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A.

L'analyse de l'expression génique des 3T3-L1 a été réalisée à l'aide du microdamier « adipochip », après extractions de l'ARN total et rétrotranscriptions des ARNm en ADNc en présence de nucléotides biotinylés. L'hybridation sur le microdamier est réalisée à partir de 20 µg du matériel biologique rétrotranscrit et révélée avec un anticorps anti-biotine conjugué à la cyanine 3. La figure 3.1 illustre une hybridation d'ADNc générés à partir de cellules contrôles, incubées en présence d'antimycine A ou de cellules différenciées. Des programmes informatiques permettent de quantifier et de normaliser les données brutes de fluorescence obtenues par le scan du damier suite à l'intensité de fluorescence émise au niveau de chaque spot afin d'analyser l'expression génique. Pour rappel, le microdamier « adipochip » est constitué de 89 sondes trappeurs d'intérêt qui correspondent à des gènes qui présentent une modification de l'expression au cours de l'adipogenèse des 3T3-L1. Les 89 gènes sont répartis en 10 classes et l'analyse comparative de l'expression génique des 3T3-L1 (au niveau de leur transcrit) incubés pendant 8 jours avec l'inhibiteur mitochondrial ou le cocktail pro-adipogène sera présentée classe par classe pour plus de clarté (tableau 3.1).

Pour rappel, l'expression d'un gène d'intérêt dans la condition « test » (cellules traitées avec l'antimycine A à 10 nM ou avec un cocktail pro-adipogène) est normalisée par rapport à une série de contrôles internes présentés dans la partie « Matériel et Méthodes » et est exprimée en valeur relative par rapport à l'expression de ce gène dans la condition référence constituée de cellules contrôles. Une valeur notée « non détectée » (ND) (valeur dont l'intensité de fluorescence est inférieure à 2,5 fois le bruit de fond local) signifie qu'aucun signal significatif n'a été détecté dans les deux conditions. De plus, on distingue des valeurs normalisées « quantitatives » et des valeurs normalisées « qualitatives ». Une valeur quantitative signifie qu'une intensité de fluorescence supérieure à 2,5 fois le bruit de fond local a pu être détectée pour la même sonde trappeur dans les deux conditions (test et référence). Une valeur qualitative signifie qu'aucun signal significatif (càd supérieur à 2,5 fois le bruit de fond local) n'a pu être détecté dans l'une des deux conditions. La valeur chiffrée donnée par le programme de normalisation pour ces données qualitatives n'est donc pas à prendre en considération. Elle reflète une sur- ou sous-expression plus ou moins élevée du



Classe de gènes	Gènes	Antimycine A	Cocktail pro-adipogène
Hormones/cytokines/facteurs de croissance	Acrp30	ND	++++
	Adipsin	--	70,25
	Agt	-	14,55
	IL-6	ND	ND
	Leptin	ND	ND
	PAI-1	++++	+
	PEDF	-1,67	-2,78
	Renin	+	ND
	Resistin	ND	++++
	SDF-1	-4,76	-3,45
	SDF-2	2,33	-7,69
	SPARC	-1,59	-1,92
	TF	-1,01	-3,03
	TGF-β1	3,9	1,59
	TNF-α	ND	ND
	VEGF A	1,68	3,01
	VEGF B	1,26	-1,11
	VEGF C	-2,04	-6,25
	Wnt-10b	ND	ND
Récepteurs membranaires	ATR I	1,54	-1,28
	ATR II	++++	ND
	β3-AR	ND	+
	ERα	1,05	1,52
Protéines de stress	HSP 60	3,7	3,41
	HSP 84	1,65	-1,1
	HSP 86	3,45	-1,27
Transporteurs membranaires	AAAT	1,59	3,49
	GLUT-4	+	++
	mtCLIC/Clic4	1,99	1,85

#### Légende :

ND	Non détecté
en vert	-1,5 < <1,5
qualitatif	<-26 - - - -
	-26 < <-11 - - -
	-11 < <-6 - -
	-6 < <-1,5 -
	1,5 < <6 +
	6 < <11 ++
	11 < <26 +++
	>26 ++++
quantitatif	

Tableau 3.1 (A). Tableau présentant l'analyse comparative des profils d'expression des gènes obtenus pour des pré-adipocytes préalablement incubés pendant 8 jours en présence d'antimycine A (AA) et des adipocytes différenciés pendant 8 jours (cocktail pro-adipogène).



gène dans une des deux conditions (test ou référence). Pour clarifier la présentation des résultats, nous avons attribué à ces valeurs qualitatives des sigles + ou – dont le nombre est fonction de l'importance de la sur- ou sous-expression génique obtenue. Faute de triples d'extraction permettant de calculer la signification statistique des résultats obtenus lors de ce travail, nous considérons que les changements d'expression génique compris entre -1,5 et 1,5 ne reflètent pas, respectivement, une sous- ou une surexpression (en vert dans le tableau 3.1).

Remarquons enfin que la technique du microdamier à ADN permet de mesurer des variations éventuelles dans l'abondance du transcrit de chaque gène analysable par le microdamier, mais par souci de commodité pour le lecteur, nous parlerons simplement de sur- ou sous-expression. Cependant, nous sommes conscients que l'« expression » d'un gène est un processus régulé à différentes étapes, et que l'abondance de l'ARNm d'un gène donné peut varier indépendamment du taux de transcription de ce gène, et peut résulter, par exemple, de mécanismes de stabilisation ou de dégradation de l'ARNm. L'expression d'un gène peut encore résulter d'une modification de la vitesse de la traduction. Ces régulations post-transcriptionnelles sont très importantes dans l'expression d'un gène en une protéine fonctionnelle, mais elles ne sont pas prises en compte pour l'interprétation des données obtenues par la technique que nous utilisons ici.

### **1.1.1 Comparaison de l'expression différentielle de gènes dans des 3T3-L1 incubés pendant 8 jours avec l'antimycine A ou le cocktail pro-adipogène**

#### *1.1.1.1 Hormones/cytokines/facteurs de croissance*

Parmi les adipokines sécrétées par le tissu adipeux, les gènes codant pour la résistine, l'Acrp30, l'AGT et l'adipsine sont fortement surexprimés dans les adipocytes différenciés, ce qui confirme les données de la littérature. Par contre, ces gènes sont sous-exprimés ou leurs transcrits non détectés dans les pré-adipocytes incubés 8 jours en présence d'antimycine A (tableau 3.1 (A)). Pour rappeler leur rôle, la résistine est impliquée dans la résistance à l'insuline (Steppan, Bailey et al. 2001) et l'Acrp30 augmente la tolérance au glucose en augmentant la sensibilité à l'insuline (Beltowski 2003). L'AGT favorise le recrutement et la croissance des pré-adipocytes. L'adipsine est une enzyme-clé dans la production d'ASP, un stimulant puissant de la synthèse *in vitro* des triglycérides dans les adipocytes en différenciation (Cianflone 2003).

Le gène codant pour SDF-2 est légèrement surexprimé dans les pré-adipocytes présentant un dysfonctionnement mitochondrial (+ 2,33) alors qu'il est sous-exprimé dans les adipocytes différenciés (- 7,69). Le gène codant pour PAI-1 n'est pas à proprement parlé une hormone, une cytokine ou un facteur de croissance mais il est souvent repris dans cette catégorie dans la littérature. Bien que détecté de manière qualitative, il est également surexprimé dans les pré-adipocytes soumis à une inhibition de leur activité respiratoire (+++), ainsi que, dans une moindre mesure (+), dans les adipocytes différenciés. L'expression de PAI-1, qui n'est pas à proprement parlé une hormone, une cytokine ou un facteur de croissance est souvent repris dans cette catégorie dans la littérature, lors de la différenciation des adipocytes pourrait donc expliquer le niveau plasmatique élevé de PAI-1 chez les sujets obèses (Mertens and Van Gaal 2002). De plus, une augmentation de l'expression de PAI-1 induite par le TNF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$ 1 a déjà été rapportée dans les adipocytes (Loskutoff and Samad 1998). La surexpression de TGF- $\beta$ 1 dans les pré-adipocytes traités avec l'antimycine A (+ 3,9) pourrait donc être un facteur qui contribue à la surexpression de PAI-1 mesurée dans les mêmes conditions. Rappelons cependant que le rôle physiologique du TGF- $\beta$  dans les adipocytes n'est pas encore clair, car c'est également un inhibiteur de l'adipogenèse (Choy, Skillington et al. 2000). Parmi les adipokines dont



l'expression est réduite dans les deux conditions, on retrouve PEDF, SDF-1, SPARC et VEGF C (tableau 3.1 (A)).

L'expression des gènes codant pour le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, la leptine et Wnt-10b n'est pas détectable par l'analyse en microdamier et ce, quelque soit la condition expérimentale (tableau 3.1 (A)).

#### 1.1.1.2 Récepteurs membranaires

Les récepteurs ATRI et ATRII sont surexprimés, respectivement très faiblement (+ 1,54) et fortement (+++++) dans les pré-adipocytes présentant une inhibition de leurs phosphorylations oxydatives. Le gène codant pour le récepteur adrénergique  $\beta 3$  ( $\beta 3$ -AR) n'est pas détecté dans les 3T3-L1 incubés avec l'antimycine A. Par contre, ce gène est légèrement surexprimé dans les adipocytes différenciés (+), un résultat en accord avec la littérature (Greenberg, Shen et al. 2001) (tableau 3.1 (A)).

#### 1.1.1.3 Protéines de stress

Cette classe comprend des sondes de capture pour des gènes codant trois protéines de stress de type HSP (*heat shock protein*) : HSP 60, HSP 84 et HSP 86. Les protéines HSP sont appelées communément « chaperonnes » car elles présentent une affinité pour les surfaces hydrophobes des protéines à l'état non natif et favorisent le repliement de ces protéines selon un processus dépendant de l'ATP (« foldases ») (Bukau and Horwich 1998). Par exemple, des chaperonnes interagissent avec les protéines mitochondriales adressées à la matrice mitochondriale et favorisent le dépliement nécessaire à leur importation à travers les deux membranes mitochondriales et l'espace intermembranaire. Dans la matrice mitochondriale, d'autres chaperonnes vont faciliter le repliement de ces protéines dans leur conformation fonctionnelle (Hood, Adhietty et al. 2003). L'expression de ces protéines est donc intéressante à étudier dans un contexte de stress mitochondrial et de communication rétrograde, spécialement pour HSP 60 qui est présente dans la matrice mitochondriale (Hood, Adhietty et al. 2003). Nous constatons que le gène codant HSP 60 est surexprimé dans les deux conditions expérimentales (environ + 3,5) (tableau 3.1 (A)). Rappelons que le contenu en ATP des adipocytes différenciés est également diminué de 40 % par rapport au contenu en ATP dans des pré-adipocytes (S. Vankoningsloo, thèse en cours).

La protéine de stress HSP 90 est constituée des produits des gènes murins hsp 84 ou hsp 86, qui sont différenciellement exprimés en réponse aux stress (oxydatifs et thermiques) et en réponse à des facteurs de croissance et de développement (Dale, Tang et al. 1997). Nous observons une surexpression de ces deux gènes dans les pré-adipocytes soumis à une inhibition de leurs phosphorylations oxydatives mais pas dans les adipocytes différenciés (tableau 3.1 (A)).

#### 1.1.1.4 Transporteurs membranaires

AAAT est un transporteur d'acides aminés surexprimé en réponse à l'insuline (Liao and Lane 1995). Le gène codant pour ce transporteur est surexprimé dans les adipocytes différenciés, comme attendu ((Zhu, Liao et al. 2000). Son expression dans les pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A est beaucoup plus faible (+ 1,59) que dans les adipocytes différenciés (+ 3,49) (tableau 3.1 (A)).

GLUT-4 est un transporteur de glucose inséré en membrane plasmique et principalement stocké dans la membrane de vésicules intracellulaires. L'activation du récepteur à l'insuline stimule la translocation de ces vésicules intracellulaires en membrane plasmique (Pessin, Thurmond et al. 1999). Le gène codant pour GLUT4 est surexprimé dans les deux conditions expérimentales (tableau 3.1 (A)).

Classe de gènes	Gènes	Antimycine A	Cocktail pro-adipogène
Facteurs et machinerie de transcription	C/EBP $\alpha$	-	12,86
	C/EBP $\beta$	1,18	-1,05
	C/EBP $\delta$	-1,08	-1,32
	CHOP10	5,24	1,01
	CREB	1,31	-1,32
	GATA 2	ND	-
	GATA 3	+	--
	NFATC2	ND	-
	NFATC4	-1,39	1,06
	PPAR $\delta$	1,32	1,9
	PPAR $\gamma$	2,14	18,09
	RXR $\alpha$	1,21	1,03
	RXR $\gamma$	ND	-2,04
	Smad 3	-1,23	-1,69
	SREBP-1	-1,16	1,71
	Stat 6	-	-1,04
	TBP	ND	ND
Protéines de structure	Actin	1,41	-1,69
	ADD1	-1,28	-1,85
	caveolin-1 $\beta$	3,83	2,91
	caveolin-2	ND	4,3
	Coll VI $\alpha$ 2	-1,79	1,81
	Cystatin C	-1,01	-1,89
	Gelsolin	1,07	1,13
	MMP-2	-2,33	-1,72
Cycle cellulaire	Cyclin D3	1,02	1,65
	p18	-	2,96

### Légende :

ND Non détecté

en vert -1,5 < 1,5

qualitatif <-26 ----

-26 < -11 ---

-11 < -6 --

-6 < -1,5 -

1,5 < 6 +

6 < 11 ++

11 < 26 +++

>26 ++++

quantitatif

Tableau 3.1 (B). Tableau présentant l'analyse comparative des profils d'expression des gènes obtenus pour des pré-adipocytes préalablement incubés pendant 8 jours en présence d'antimycine A (AA) et des adipocytes différenciés pendant 8 jours (cocktail pro-adipogène).



mtCLIC est un canal à chlore intracellulaire identifié initialement dans la MMI et le cytosol des kératinocytes, qui participe, suite à sa translocation nucléaire et par un mécanisme encore inconnu, à la réponse apoptotique induite par de multiples stress comme l'étoposide, le TNF- $\alpha$  ou la mitomycine. Le gène codant pour mtCLIC est légèrement surexprimé dans nos deux conditions expérimentales : + 1,99 et + 1,85 pour respectivement un traitement à l'antimycine A et la différenciation (tableau 3.1 (A)). Ces surexpressions sont en accord avec des données de la littérature qui montrent une surexpression de mtClic dans d'autres types cellulaires comme des cellules L929 et 143B déplétées en ADNmt ( $\rho^0$ ) (Arnould, Mercy et al. 2003). Kitamura et collaborateurs ont également montré, par une analyse en Northern blotting, que mtClic est un gène surexprimé transitoirement dans les pré-adipocytes en différenciation.

#### 1.1.1.5 Facteurs et machinerie de transcription

L'expression des gènes codant pour les facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  ne varie pas dans les deux conditions expérimentales. Ces deux facteurs de transcription sont surexprimés durant la phase initiale de la différenciation adipocytaire, mais il est en effet connu que leur expression retourne au niveau basal 2-3 jours après l'induction du programme (McDougald and Lane, 1995). CHOP 10, qui peut interagir avec les autres membres de la famille C/EBP comme C/EBP $\beta$  (Zhang, Klemm et al. 2004) et inhiber leur activité par un mécanisme de type « dominant négatif naturel », est surexprimé dans les cellules incubées en présence d'antimycine A (+ 5,24). Une donnée en accord avec une publication récente qui montre que l'antimycine A induit la surexpression de CHOP 10 par un mécanisme dépendant des ROS (Carrière *et al.*, 2004). Le facteur de transcription C/EBP $\alpha$  qui contrôle la transcription de nombreux gènes en phase de différenciation terminale (comme GLUT4 ou SCD1) et maintient le phénotype différencié des adipocytes (MacDougald and Lane, 1995), est effectivement surexprimé dans les 3T3-L1 en fin de programme de différenciation (+ 12,86) mais est sous-exprimé en présence d'antimycine A (-). C/EBP $\alpha$  agit seul ou en synergie avec le facteur de transcription PPAR $\gamma$ , préalablement dimérisé au facteur RXR $\alpha$  et activé par la liaison de ligands naturels ou synthétiques (Hamm, Park et al. 2001). Le gène codant pour le facteur de transcription PPAR $\gamma$  est surexprimé dans les deux conditions expérimentales (+ 18,09 dans la différenciation adipocytaire et + 2,14 en présence d'antimycine A), mais l'expression de RXR $\alpha$  ne varie pas dans ces deux conditions. Le facteur de transcription SREBP-1, un autre régulateur de l'adipogenèse qui contribue notamment à la production de ligands pour PPAR $\gamma$  (Rosen and Spiegelman 2000), est légèrement surexprimé en fin de différenciation (+ 1,71) mais son expression est inchangée dans les cellules incubées en présence d'antimycine A. Les facteurs de transcription GATA-2 et GATA-3, constitutivement exprimés dans les pré-adipocytes, les maintiennent dans un état indifférencié en inhibant l'expression du facteur PPAR $\gamma$ . Leur expression est réduite en fin de différenciation des 3T3-L1 comme nous le montrons dans notre analyse avec le microdamier (- 5,56 et - 7,69 pour respectivement GATA-2 et GATA-3). Par contre, GATA-3 est surexprimé dans les 3T3-L1 après 8 jours d'incubation avec l'antimycine A (+), alors que GATA-2 n'est pas détecté (tableau 3.1 (B)).

#### 1.1.1.6 Protéines de structure

Nous mesurons peu de variations dans l'expression de la majorité des gènes codant pour des protéines de structure, quelle que soit la condition. Seules les cavéolines cav-1 $\beta$  et cav-2 sont nettement surexprimées en fin de différenciation adipocytaire (+ 2,91 et + 4,30 respectivement). L'antimycine A induit également une forte surexpression de la cav-1 $\beta$  (+ 3,83). Les cavéolines 1 et 2 forment un complexe hétéro-oligomérique stable *in vivo*, et sont



Classe de gènes	Gènes	Antimycine A	Cocktail pro-adipogène
Métabolisme glucides/lipides	ASP	-33,33	1,34
	CL	1,41	1,56
	CPT-1I	-1,14	-2,13
	CPT-1m	ND	ND
	CPT-2	1,38	5,25
	DHAPAT	1,64	5,41
	Fabp 4	3,1	40,83
	FAS	-1,19	4,99
	GAPDH	1,59	2,48
	GPAT mit	ND	2,91
	GPD cyto	ND	++++
	GPD mito	+	1,28
	Gyk	ND	ND
	HSD 11b	ND	18,9
	HSL	-1,22	6,2
	I-PK	2,13	1,58
	LPL-1	-2,94	1,84
	MCAD	-1,82	2,96
	PEPCK-1	ND	ND
	Plin A	1,13	1,15
	Scd-1	+	164,38
	Scd-2	1,29	6,89
	UCP-2	1,45	3,56
Transduction du signal	CaMK II	1,23	-2,86
	CaMK IV	ND	ND
	eNOS	1,25	-1,06
	iNOS	ND	ND
	p110 $\alpha$	ND	-1,33

### Légende :

ND Non détecté

en vert -1,5 < 1,5

qualitatif <-26 - - - -

-26 < -11 - - -

-11 < -6 - -

-6 < -1,5 -

1,5 < -6 +

6 < 11 ++

11 < 26 +++

>26 ++++

quantitatif

Tableau 3.1 (C). Tableau présentant l'analyse comparative des profils d'expression des gènes obtenus pour des pré-adipocytes préalablement incubés pendant 8 jours en présence d'antimycine A (AA) et des adipocytes différenciés pendant 8 jours (cocktail pro-adipogène).



localisées dans des régions spécialisées de la membrane plasmique : les cavéoles. Les cavéoles sont des microdomaines membranaires qui jouent un rôle important dans les processus de transduction du signal et de transport des vésicules, et sont particulièrement abondantes dans les cellules différenciées telles que les adipocytes (Scherer, Lewis et al. 1997). Certaines cavéolines, dont la cav-2 $\beta$ , seraient également présentes à la surface des gouttelettes lipidiques dans les adipocytes différenciés (Dugail 2001). Cependant, le transcrit du gène codant pour cette protéine, fortement surexprimé dans les adipocytes différenciés, n'est pas détecté dans les pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A. Mentionnons également une légère diminution de l'expression de MMP-2, une métalloprotéinase impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire, et ce, dans les deux conditions expérimentales étudiées (- 2,33 et - 1,72 respectivement en présence d'antimycine A et du cocktail adipogénique) (tableau 3.1 (B)).

#### 1.1.1.7 Cycle cellulaire

p18 présente un profil d'expression inversé dans les deux conditions expérimentales : une sous-expression dans les pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A (-) et une surexpression en fin de différenciation (+ 2,96), comme attendu (Morrison and Farmer 2000). L'expression de la cycline D3, quant à elle, ne varie pas ou peu dans les deux conditions (tableau 3.1 (B)).

#### 1.1.1.8 Métabolisme des glucides et des lipides

Les acides gras constituent une réserve d'énergie importante pour différents types cellulaires. Leur catabolisation implique principalement le cycle de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras, dont la première réaction est catalysée par la MCAD. Son expression augmente dans les adipocytes différenciés (+ 2,96) mais diminue dans les pré-adipocytes traités avec l'antimycine A (- 1,82) (tableau 3.1 (C)).

A l'inverse, la synthèse des acides gras se produit dans le cytosol à partir d'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA peut être carboxylé en malonyl-CoA par l'ACC, la principale enzyme régulatrice de la voie de synthèse des acides gras. Dans une deuxième étape, le malonyl-CoA est utilisé comme substrat par la FAS, qui assure l'élongation des chaînes d'acides gras lors du processus de lipogenèse, notamment au cours de la différenciation adipocytaire (Jayakumar, Chirala et al. 1997). En accord avec les données de la littérature, nous mesurons une forte augmentation de l'expression de la FAS dans les adipocytes différenciés (+ 4,99), alors que l'antimycine A n'induit pas de variation dans l'expression du gène codant pour cette enzyme. SCD-1 et 2 catalysent la formation d'acides gras mono-insaturés à partir d'acides gras estérifiés au CoA (acyl-CoA). La synthèse des acides palmitique et oléique, qui sont les formes principales d'acides gras insaturés retrouvés dans les triglycérides des adipocytes 3T3-L1, est catalysée par SCD-1 (Kaestner, Ntambi et al. 1989). Comme attendu, les deux gènes codant pour ces enzymes sont fortement surexprimés dans les adipocytes différenciés, spécialement SCD-1 (+ 164,38). L'antimycine A induit également une légère augmentation (détectée comme qualitative) de l'expression de SCD-1 (+) (tableau 3.1 (C)).

Le transport des acides gras dans la matrice mitochondriale, lieu de leur  $\beta$ -oxydation, est assuré par le système CPT. Le gène codant pour la CPT-11 est sous-exprimé dans les adipocytes différenciés (- 2,13), alors que son expression ne varie pas dans les cellules incubées en présence d'antimycine A. Le transcrit de l'isoforme musculaire de la CPT-1 (CPT-1m) n'est détecté dans aucune des deux conditions. Enfin, le gène de la CPT-2 est surexprimé dans les adipocytes différenciés (+5,25), comme attendu (Brown, Hill et al. 1997) et vérifié au laboratoire par PCR en temps réel (M. Piens, mémoire de licence 2002), mais ne change pas dans les cellules incubées en présence d'antimycine A. La protéine Fabp4/aP2 transporte les acides gras dans le cytosol et les présente aux enzymes qui les métaboliseront



(Uysal, Scheja et al. 2000). Sa très forte surexpression dans les adipocytes différenciés (+ 40,83) explique pourquoi cette protéine est utilisée comme marqueur de la différenciation dans de très nombreuses études portant sur l'adipogenèse. De façon intéressante, l'expression de Fabp4/aP2 analysée au niveau de l'abondance des transcrits augmente également en présence d'antimycine A (+ 3,1) (tableau 3.1 (C)). Cependant, l'analyse de l'abondance de la protéine en Western blotting n'est pas modifiée dans les 3T3-L1 incubés en présence d'antimycine A pendant 8 jours (S. Vankoningsloo, thèse en cours).

La GAPDH contrôle la sixième étape de la glycolyse, soit l'oxydation et la phosphorylation du GAP (glycéraldéhyde-3-phosphate) en 1,3-BPG (1,3-biphosphoglycérate). Le gène de la GAPDH est couramment utilisé en tant que *housekeeping gene* dans les études d'expression par microdamier à ADN, mais dans nos deux modèles, son expression est légèrement augmentée (+ 1,59 en présence d'antimycine A et + 2,48 en fin de différenciation). La l-PK catalyse la dernière étape de la glycolyse, soit la conversion du phosphoénolpyruvate en pyruvate. Elle est également légèrement surexprimée dans les deux conditions expérimentales (+ 2,13 en présence d'antimycine A et + 1,58 en fin de différenciation adipocytaire) (tableau 3.1 (C)). Rappelons cependant que l'antimycine A inhibe le complexe III de la chaîne respiratoire, et la dexaméthasone, présente dans le cocktail adipogénique, inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire. Les cellules 3T3-L1 subissent donc un stress énergétique dans les deux conditions expérimentales et l'activité glycolytique est augmentée pour compenser la diminution d'ATP.

La PEPCK cytosolique, une enzyme impliquée dans la néoglucogenèse hépatique et dans la glycéronéogenèse dans le tissu adipeux, catalyse la conversion de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate, étape limitante de ces deux processus ((Beale, Forest et al. 2003); (Tontonoz, Hu et al. 1995)). La PEPCK est exprimée constitutivement dans les tissus hépatique et adipeux (Tontonoz, Hu et al. 1995). Cependant, les transcrits du gène codant la PEPCK ne sont pas détectés dans les deux conditions expérimentales. La Gyk est une enzyme importante dans le couplage entre le métabolisme du glucose et celui du glycérol. Elle catalyse la phosphorylation du glycérol, étape essentielle à sa conversion en DHAP (dihydroxy-acétonephosphate), un intermédiaire de la glycolyse. Les transcrits de la Gyk ne sont pas détectés sur le microdamier et ce, pour les deux conditions expérimentales (tableau 3.1 (C)).

La GPD, la GPAT et la DHAPAT contrôlent les premières étapes de la voie de synthèse des triglycérides. La GPD réduit le DHAP (dihydroxy-acétonephosphate) en glycérol-3-phosphate, auquel la GPAT ajoute un acide gras pour former de l'acide lysophosphatidique. La DHAPAT estérifie un acide gras directement sur la DHAP, ce qui constitue une voie alternative de la synthèse des triglycérides (Hajra, Larkins et al. 2000). L'expression des gènes codant pour la GPD cytosolique, la GPAT mitochondriale et la DHAPAT est élevée dans les adipocytes différenciés, particulièrement pour la GPD cytosolique (++++). Dans les pré-adipocytes traités avec l'antimycine A, seules la GPD mitochondriale et la DHAPAT sont très légèrement surexprimées (respectivement + et 1,64), alors que la GPD cytosolique et la GPAT mitochondriale ne sont pas détectées. La mobilisation des triglycérides dans le tissu adipeux à partir des stocks intracellulaires nécessite leur hydrolyse en glycérol et acides gras, catalysée par la HSL, une enzyme lipolytique (Su *et al.*, 2003). Le gène codant pour la HSL est surexprimé dans les adipocytes différenciés (+ 6,2) mais son expression ne varie pas dans les pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A. Le gène codant pour la LPL-1, une lipase sécrétée qui hydrolyse les triglycérides des lipoprotéines plasmatiques à la surface des cellules endothéliales (Amri, Teboul et al. 1996), est légèrement surexprimée dans les adipocytes différenciés (+ 1,84) et sous-exprimée dans les pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A (- 2,94). L'ASP stimule la synthèse des triglycérides dans les adipocytes en augmentant l'activité de la



Classe de gènes	Gènes	Antimycine A	Cocktail pro-adipogène
Divers	ARNr18S	-1,14	-1,72
	Haptoglobin	--	3,55
	HCNP	1,47	-1,08
	Pref-1	-2,13	-5
	RAB3D	1,04	+

### Légende :

ND Non détecté  
en vert -1,5 < <1,5

qualitatif	<-26	----
	-26 < <-11	---
	-11 < <-6	--
	-6 < <-1,5	-
	1,5 < <6	+
	6 < <11	++
	11 < <26	+++
	>26	++++

quantitatif

Tableau 3.1 (D). Tableau présentant l'analyse comparative des profils d'expression des gènes obtenus pour des pré-adipocytes préalablement incubés pendant 8 jours en présence d'antimycine A (AA) et des adipocytes différenciés pendant 8 jours (cocktail pro-adipogène).

diacylglycérol acyltransférase, la dernière enzyme de la voie de synthèse des triglycérides, et en stimulant l'incorporation des acides gras libres par les adipocytes. De plus, l'ASP induit la translocation des transporteurs de glucose (GLUT1 et 4) vers la membrane plasmique et inhibe la HSL ((Sniderman, Cianflone et al. 1998); (Cianflone 2003)). L'expression de l'ASP ne varie pas dans les adipocytes en différenciation terminale, tandis qu'elle est fortement sous exprimée dans les 3T3-L1 incubés avec l'antimycine A (- 33,33) (tableau 3.1 (C)).

L'expression de la CL, une enzyme cytosolique qui régénère l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate à partir du citrate exporté hors de la mitochondrie (Swergold, Rosen et al. 1982), ne varie pas ou peu dans les deux conditions (tableau 3.1 (C)).

L'HSD-11 $\beta$  est une petite protéine microsomale qui régule le métabolisme des corticoïdes. Elle est fortement surexprimée dans les adipocytes différenciés (+ 18,9), conformément à la littérature mais son expression ne varie pas dans les pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A (tableau 3.1 (C)).

Nous ne détectons pas de variation dans l'expression de Plin A, une protéine présente en périphérie des vésicules de triglycérides, quelle que soit la condition considérée (tableau 3.1 (C)).

La protéine UCP-2 est une protéine découplante mitochondriale qui diminue le potentiel de membrane généré par la chaîne de transporteurs d'électrons. UCP-2 régule notamment le maintien d'un potentiel rédox et une diminution de la production de ROS par la mitochondrie (Rial, Aguirregoitia et al. 2004). Son expression augmente dans les adipocytes en différenciation (+ 3,56), une donnée en accord la littérature, mais elle ne varie pas dans les pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A (tableau 3.1 (C)). Des analyses de l'abondance de la protéine UCP-2 en Western blotting réalisées au laboratoire montrent bien une augmentation de l'expression d'UCP-2 dans les cellules différenciées mais une expression inchangée dans les cellules traitées avec l'antimycine A (S. Vankoningsloo, thèse en cours).

#### *1.1.1.9 Transduction du signal*

L'expression des gènes de cette classe ne varie pas dans nos deux conditions expérimentales, sauf la CaMKII dont l'expression est réduite en différenciation terminale (- 2,86) (tableau 3.1 (C)).

#### *1.1.1.10 Divers*

Pref-1 est un inhibiteur de l'adipogenèse exprimé dans la membrane plasmique des pré-adipocytes et également sécrété dans le milieu extracellulaire (Lee, Villena et al. 2003). Il est sous exprimé dans les deux conditions expérimentales, et plus particulièrement dans les adipocytes différenciés (-2,13 en présence d'antimycine A et - 5 en présence du cocktail pro-adipogène) (tableau 3.1 (D)).

Le gène codant l'haptoglobine, la principale protéine de liaison à l'hémoglobine, présente un profil d'expression génique intéressant. En effet, il est surexprimé dans les adipocytes différenciés (+ 3,55), conformément à la littérature (Kratchmarova, Kalume et al. 2002), mais sous-exprimé dans les pré-adipocytes 3T3-L1 incubés pendant 8 jours en présence d'antimycine A (--) (tableau 3.1 (D)).

### **1.1.2 Quantification de l'expression des gènes non détectée sur le microdamier par PCR en temps réel**

Lors de la mise au point de la quantité de matériel biologique à engager pour l'hybridation sur le microdamier « adipochip » (Matériel et Méthodes), nous n'avons jamais détecté de signal significatif de fluorescence pour 6 sondes trappeurs (celles de ATRII, de la



<b>Gènes</b>	<b>Ct(CTL)</b>	<b>Ct(AA 6 h)</b>	<b>DCT(CTL)</b>	<b>DCt(AA 6 h)</b>	<b>2<sup>-</sup>(-DDCt)</b>
<i>ATRII</i>	26,48	26,9	4,33	4,055	1,2
<i>CaMKIV</i>	34,47	35,36	12,57	12,625	0,96
<i>Wnt-10b</i>	31,205	32,13	10,445	9,125	2,5

<b>Gènes</b>	<b>Ct(CTL)</b>	<b>Ct(Diff 8 J)</b>	<b>DCT(CTL)</b>	<b>DCt(Diff 8 J)</b>	<b>2<sup>-</sup>(-DDCt)</b>
<i>IL-6</i>	27,635	31,25	4,995	8,17	0,11
<i>leptine</i>	30,175	27,96	7,535	4,88	6,3
<i>TNF- α</i>	30,115	31,36	7,475	8,28	/

Tableau 3.2. Tableau reprenant les valeurs de Ct obtenues dans les conditions contrôles (CTL) et tests (antimycine A : AA, différenciation : Diff) à la dilution 10 fois. Les  $\Delta Ct$  sont calculés par rapport aux Ct de TBP et l'abondance relative des ADNc ( $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ) est donnée pour chacun des 6 transcrits non détectés sur le microdamier.

CaMKIV, de l'IL-6, de la leptine, du TNF- $\alpha$  et de Wnt-10b) même lors d'une hybridation engageant des ADNc produits à partir de 40  $\mu$ g d'ARN total extraits à partir de 3T3-L1 incubés pendant 2 et 8 jours en présence d'antimycine A ou du cocktail adipogénique. L'absence de détection des transcrits de la leptine, du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 sont particulièrement problématiques, car ces adipokines sont connues pour être exprimées *in vivo* par les adipocytes d'individus obèses. Cette absence de signal pourrait être due à une séquence inadéquate des sondes trappeurs, à l'absence des 6 transcrits dans les cellules, ou à une très faible expression des gènes d'intérêt dans ces conditions.

Afin de rechercher l'abondance relative de ces transcrits dans les cellules, nous avons réalisé des PCR en temps réel. Cette technique permet une amplification exponentielle et sélective de séquences d'ADN cibles et possède donc une sensibilité plus élevée que la technique du damier à ADN, dans laquelle la rétrotranscription des ARNm ne s'accompagne pas d'une amplification par PCR. Nous avons donc rétrotranscrit les ARNm à partir d'ARN total extrait de pré-adipocytes ou d'adipocytes 3T3-L1 et nous avons amplifié les séquences d'intérêt correspondant aux séquences des 6 sondes trappeurs par PCR en temps réel. Etant donné que ces 6 gènes présentent une cinétique d'expression différente au cours de la différenciation adipocytaire, nous avons choisi, sur base de la littérature, les temps d'incubation auxquels l'expression de chaque gène est décrite pour être maximale. Ainsi, les séquences de Wnt-10b, de la CaMKIV et d'ATRII ont été amplifiées à partir d'extraits d'ARN total provenant de pré-adipocytes contrôles ou incubés en présence d'antimycine A pendant 6 h, et celles du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6 et de la leptine à partir d'extraits d'ARN total provenant de pré-adipocytes contrôles ou d'adipocytes différenciés pendant 8 jours.

On constate au tableau 3.2 que le Ct pour l'amplification de Wnt-10b, de la CaMKIV et de ATRII est élevé, de l'ordre de 26 Ct ou plus, dans les conditions contrôles (CTL) et antimycine A (AA) 6 h, signe de la faible abondance des transcrits. Malgré cette détection tardive, une amplification a eu lieu et nous avons pu quantifier l'abondance relative des ADNc correspondants. Le gène codant Wnt-10b, un répresseur de l'adipogenèse, est surexprimé dans les 3T3-L1 après 6 h d'incubation en présence d'antimycine A et les gènes codant la CaMKIV et ATRII ne varient pas dans cette condition. Nous avons également obtenu des Ct relativement élevés pour l'amplification de la leptine, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  dans les conditions contrôles (CTL) et différenciation (Diff). Cependant, après calcul, on constate que la leptine est bien surexprimée dans les adipocytes différenciés (+ 6,3) par rapport aux pré-adipocytes, ce qui est accord avec les données de la littérature (Cohen, Barkan et al. 2001). L'IL-6 est fortement sous-exprimée (0,11) dans les adipocytes différenciés. Enfin, nous n'avons pas pu calculer l'abondance relative des ADNc pour le TNF- $\alpha$ , les courbes d'efficacité de la PCR (données par les valeurs de Ct en fonction du logarithme de la dilution en ADNc) dans les deux conditions contrôle et différenciation ayant une pente trop élevée. Une courbe de dilution des amorces devra être refaite afin d'optimiser la concentration en amorces avant de recommencer cette analyse.

Nous pouvons donc conclure que l'amplification par PCR en temps réel s'est bien déroulée pour les amplicons correspondant aux 6 séquences utilisées comme sondes de capture sur le microdamier. L'abondance relative des ADNc a pu être quantifiée pour 5 des 6 transcrits. Ces résultats montrent que les transcrits de ces gènes sont bien présents dans les 3T3-L1 probablement en faible abondance et que l'absence de leur détection sur le microdamier pourrait être expliquée par le seuil de sensibilité du microdamier ne permettant pas de détecter des transcrits peu abondants. Cependant, ces résultats devront être confirmés par des triples de mesure par PCR en temps réel.



### 1.1.3 Confrontations des résultats obtenus par rapport à la littérature

Jusqu'à présent, nous avons analysé les profils d'expression génique de pré-adipocytes 3T3-L1 incubés pendant 8 jours en présence d'antimycine A ou d'un cocktail pro-adipogène. Rappelons que notre but est de mieux comprendre les mécanismes responsables de la formation de vésicules de triglycérides dans des pré-adipocytes induite par l'antimycine A. Pour cela, nous avons utilisé la technique du damier à ADN car ce phénomène résulte probablement de l'intégration des modifications d'expression de nombreux gènes, tout comme l'accumulation de triglycérides observés lors d'un programme de différenciation adipocytaire induite par un cocktail pro-adipogène. Ce modèle de différenciation adipocytaire a été largement étudié dans les cellules 3T3-L1 : il est utilisé dans ce travail comme un modèle de référence pour l'analyse comparative des modifications d'expression génique dans des 3T3-L1 soumis à une inhibition des phosphorylations oxydatives.

En effet, nous avons pu quantifier comme attendu, la surexpression de nombreux gènes adipogéniques couramment utilisés comme marqueurs de la différenciation terminale des 3T3-L1, tel que les gènes codant pour le facteur de transcription C/EBP $\alpha$ , pour des protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras (Fabp4, FAS, SCD-1, SCD-2 et CPT-2) ou des triglycérides (GPD cyto, GPAT mito et DHAPAT), pour différentes adipokines (Acrp 30, AGT, résistine, PAI-1 et VEGF A), pour des transporteurs (GLUT4 et AAAT) et enfin, des gènes codant pour l'adipsine, le p18, la HSD-11 $\beta$  et l'UCP-2. De plus, l'expression d'inhibiteurs de la différenciation comme GATA-2, GATA-3 et Pref-1 est bien diminuée dans les adipocytes différenciés par rapport aux pré-adipocytes contrôles. Tous ces résultats sont donc compatibles avec les données de la littérature.

L'expression des gènes codant la leptine et l'IL-6 pour lesquels aucun signal de fluorescence n'avait été détecté sur le microdamier, a été quantifiée par une amplification par PCR en temps réel. La leptine est bien surexprimée (+ 6,3) mais faiblement dans les 3T3-L1 différenciés conformément à la littérature (Sliker, Sloop et al. 1998). L'IL-6 est sous-exprimée (0,11), ce qui est en contradiction apparente avec les données de la littérature. Cependant, les mesures d'expression de l'IL-6 sont couramment données sous forme de concentrations plasmatiques chez des sujets obèses. Ces données reflètent donc la production d'IL-6 par le tissu adipeux qui contient, entre autres des macrophages, cellules grandes productrices d'IL-6 (Bryniarski *et al.*, 2003). En outre, il est possible que l'expression de l'IL-6, très faible dans les 3T3-L1 différenciés *in vitro*, ne soit pas représentative de la situation *in vivo* dans les adipocytes du tissu adipeux. Ceci a déjà été observé dans une étude qui rapporte que de nombreux gènes surexprimés dans le tissu adipeux de sujets obèses ne le sont pas dans les 3T3-L1 différenciés *in vitro* (Nadler *et al.*, 1994). L'expression des gènes codant pour ATRII, Wnt-10b et CaMKIV, non détectée sur le microdamier, a également été analysée par PCR en temps réel. L'amplification tardive (Ct élevé) reflète un taux d'expression extrêmement faible dans les cellules 3T3-L1. Ceci a été confirmé au laboratoire pour la CaMKIV au niveau protéique, qui n'est pas détectée en Western blotting sur des lysats clairs de 3T3-L1, mais bien après immunoprécipitation et donc enrichissement en enzyme, ce qui confirme la faible abondance de la CaMKIV dans ces cellules (S. Vankoningsloo, thèse en cours).

Les résultats obtenus au niveau de l'abondance des transcrits pour le gène de l'UCP-2 ont également été confirmés au niveau protéique par des analyses en Western blotting. En effet, l'abondance d'UCP-2 augmente dans les 3T3-L1 en différenciation terminale mais est inchangée en présence d'antimycine A. Ces résultats sont en accord avec les valeurs d'expression relative obtenues sur le microdamier (+ 3,56 en différenciation et + 1,45 en présence d'AA). L'augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  (+ 2,14) dans les 3T3-L1 incubés



pendant 8 jours avec l'antimycine A est aussi liée à une augmentation de l'abondance de la protéine dans des lysats cellulaires (S. Vankoningsloo, thèse en cours).

Par contre, la surexpression de Fabp4 (+ 3,1) dans les 3T3-L1 traités avec l'antimycine A n'a pas été confirmée par l'analyse de l'abondance de la protéine en Western blotting. En effet, l'abondance de Fabp4 demeure faible et constante pendant les 8 jours du programme d'inhibition mitochondriale. Ces données soulignent le fait que des variations d'abondance du transcrit d'un gène ne reflètent pas toujours des modifications d'expression au niveau de la protéine.

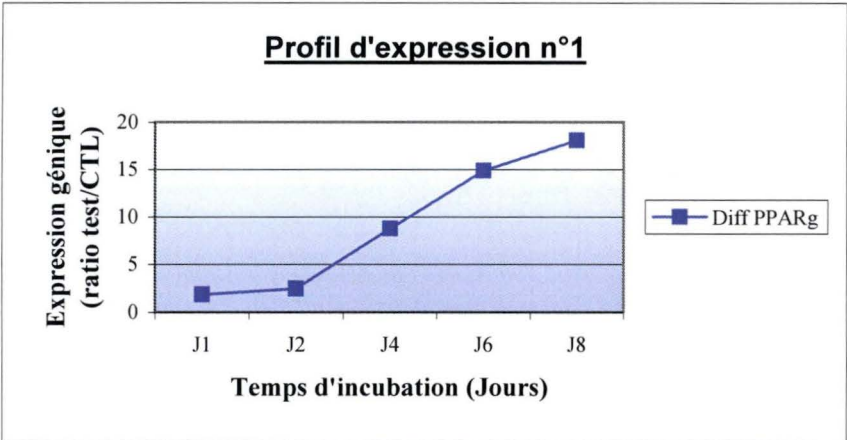
Etant donné que l'accumulation de triglycérides dans les adipocytes en différenciation est le résultat d'une activation séquentielle et coordonnée de facteurs de transcription qui activent des gènes spécifiquement exprimés dans les adipocytes, il est intéressant d'analyser la cinétique des changements d'expression génique dans des pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A, afin de pouvoir définir certains profils d'expression. Parallèlement à la cinétique de l'expression différentielle de gènes dans des pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A, une cinétique de l'expression différentielle de gènes dans des pré-adipocytes incubés en présence du cocktail pro-adipogène a également été réalisée.

## **1.2 Analyse des cinétiques d'expression de gènes dans des pré-adipocytes incubés en présence de l'inhibiteur mitochondrial ou du cocktail pro-adipogène**

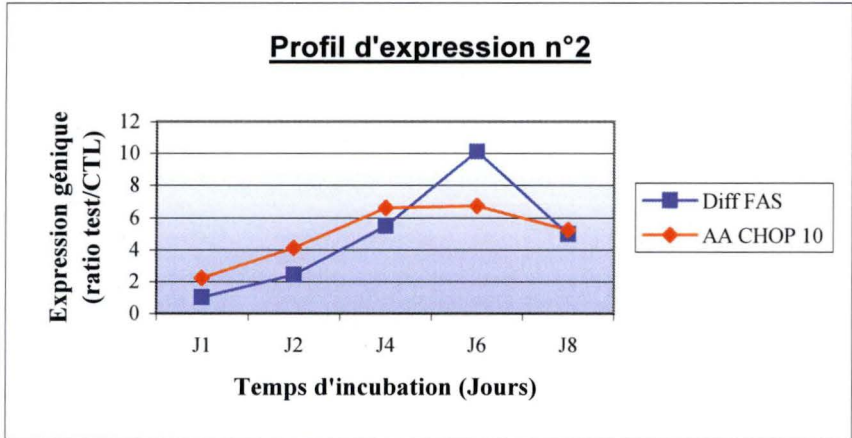
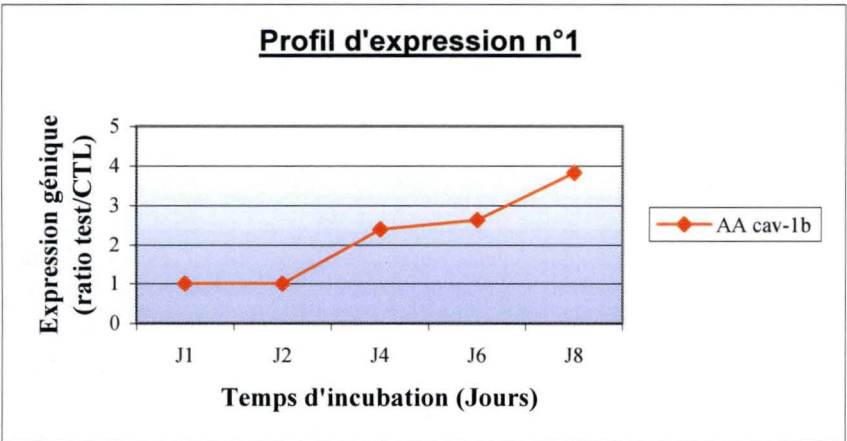
Après avoir analysé les profils d'expression génique dans des pré-adipocytes 3T3-L1 incubés pendant 8 jours avec l'antimycine A ou le cocktail pro-adipogène, nous allons maintenant étudier les profils cinétiques d'expression génique dans ces deux conditions expérimentales. Pour cela, des extractions d'ARN total à partir de 3T3-L1 ont été réalisées après 1, 2, 4, 6 et 8 jours d'incubation des cellules en présence d'antimycine A à 10 nM ou en présence du cocktail pro-adipogène. Les ARNm de chaque échantillon ont été rétrotranscrits en présence de nucléotides biotinylés puis les ADNc ont été hybridés sur le microdamier et révélés avec un anticorps antibiotine couplé à la cyanine-3. La quantité de matériel utilisée pour la rétrotranscription est toujours de 20 µg d'ARN total. Pour chaque échantillon, l'expression relative des 89 gènes d'intérêt a été quantifiée et normalisée de la même manière que pour l'analyse comparative des profils d'expression génique réalisée après 8 jours d'incubation (décrit au point 1.1) (Annexe 1).

Afin de faciliter l'analyse des résultats, les différentes cinétiques d'expression génique (dont les résultats sont présentés dans l'annexe 1) ont été regroupées par profil d'expression (figure 3.2). Sur base des analyses, nous avons établi 8 profils d'expression en fonction de la similarité des changements observés. Chaque profil est illustré par un gène d'intérêt, pour lequel une expression quantitative a pu être établie tout au long de la cinétique. Les gènes présentant un profil d'expression génique comparable au cours du temps (aussi bien quantitativement que qualitativement), dans les traitements avec l'antimycine A (AA) ou avec le cocktail pro-adipogène (Diff) sont repris dans un tableau en regard du type de chaque profil présenté (figure 3.2). Ces gènes répondent aux caractéristiques suivantes : leur expression est détectée tout au long de la cinétique, et leur profil d'expression au cours du traitement doit présenter au moins une valeur supérieure à + 2 ou inférieure à - 2. Ce seuil de 2, en valeur absolue, a été choisi parce que nous considérons (dans l'état actuel des données) que les variations d'expression génique comprises entre + 2 et - 2 ne sont pas suffisamment élevées que pour pouvoir leur attribuer une fiabilité suffisante. En effet, rappelons que ces résultats sont préliminaires et devront être confirmés par une analyse comparative de la cinétique de l'expression différentielle à partir de trois extractions différentes. Ajoutons encore qu'un seuil





Profil d'expression n°1	
Diff	AA
HSL	cav-1b
PPAR $\gamma$	HSP 86
SCD-1	



Profil d'expression n°2	
Diff	AA
AAAT	CHOP 10
AGT	TGF- $\beta$
C/EBP $\alpha$	
FAS	
Hp	
HSP 84*	

Figure 3.2 (A). Graphiques reprenant les différents profils d'expression de gènes établis à partir de la cinétique d'incubation des cellules 3T3-L1 en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM ou du cocktail pro-adipogène (Diff). Les valeurs d'expression des gènes illustrant les différents profils sont quantitatives à tous les temps d'incubation. A côté de chaque graphe, un tableau reprend les gènes dont le profil d'expression est comparable. \*: gènes dont l'expression est détectée de manière qualitative au moins à un temps au cours du traitement considéré.

arbitraire de 2 est utilisé dans la littérature pour certaines études d'expression différentielle de gènes réalisés sur des microdamiers à haute densité (Lindvall *et al.*, 2004). En outre, les valeurs d'expression qui, au cours de la cinétique, sont comprises entre -1,5 et 1,5 (expression considérée comme non variable), ont été arbitrairement portées à 1 afin d'éviter toute confusion avec une sur- ou sous-expression des gènes. La signification statistique de ces résultats ne pourra être établie qu'après avoir obtenu un nombre suffisant d'analyses à partir d'échantillons biologiques indépendants.

Finalement, ajoutons encore que par souci de clarté et pour éviter les effets de compaction dus aux échelles utilisées, des gènes qui présenteraient des profils d'expression comparables mais avec des valeurs absolues très différentes dans les deux conditions expérimentales ont été représentés sur des graphiques différents (par exemple les profils d'expression 1 et 3).

### 1.2.1 Premier profil d'expression

Ce premier profil illustre une augmentation progressive de l'expression génique, éventuellement précédée d'une phase de latence (période pendant laquelle aucune modification d'expression n'est observée), au cours de la différenciation adipocytaire des 3T3-L1 ou de l'incubation des 3T3-L1 en présence d'antimycine A (figure 3.2 (A)).

On constate ainsi une augmentation d'expression continue des gènes codant pour HSL, PPAR $\gamma$  et SCD-1 au cours de la différenciation adipocytaire. La surexpression de l'Acrp30 et de l'adipsine, deux protéines sécrétées par le tissu adipeux, est confirmée dans la littérature par des analyses transcriptomique et protéomique réalisées au cours de l'adipogenèse des 3T3-L1 (Kratchmarova, Kalume *et al.* 2002). Le gène codant pour l'enzyme HSL présente préalablement une phase de latence jusqu'au jour 2 inclu.

Parmi les gènes présentant un profil d'expression comparable dans les cellules traitées avec l'antimycine A, les expressions de la cav-1 $\beta$  et de HSP 86 ne varient pas jusqu'au jour 2 du traitement, puis augmente régulièrement. La surexpression de GATA-2 ne commence qu'à partir du quatrième jour d'incubation des cellules avec l'antimycine A.

### 1.2.2 Second profil d'expression

Ce second profil illustre une surexpression avec un maximum au jour 6 du traitement (figure 3.2 (A)).

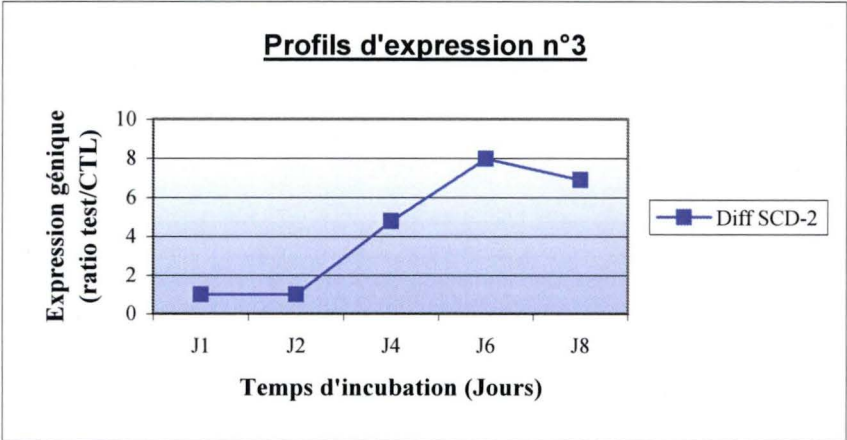
L'expression des gènes codant pour le transporteur d'acides aminés AAAT, l'adipokine AGT, le facteur de transcription C/EBP $\alpha$ , une enzyme du métabolisme lipidique FAS, la protéine de stress HSP 84 et la protéine Hp augmente progressivement pendant les 6 premiers jours de l'adipogenèse, puis diminue plus ou moins fortement. La surexpression du gène codant pour C/EBP $\alpha$  que nous observons au cours des 6 premiers jours de la différenciation adipocytaire est corrélée à une augmentation de l'abondance de la protéine (McDougald and Lane, 1995).

Lors de l'inhibition des phosphorylations oxydatives par l'antimycine A dans les pré-adipocytes 3T3-L1, seuls les gènes codant pour CHOP10 et TGF- $\beta$ 1 présentent un profil d'expression comparable.

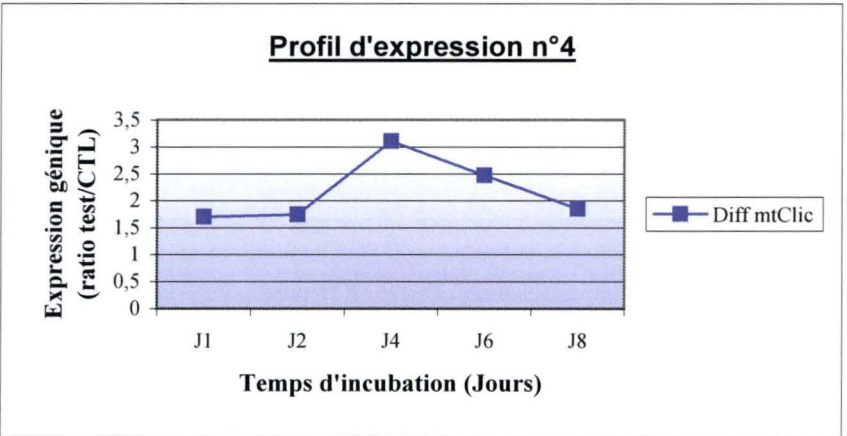
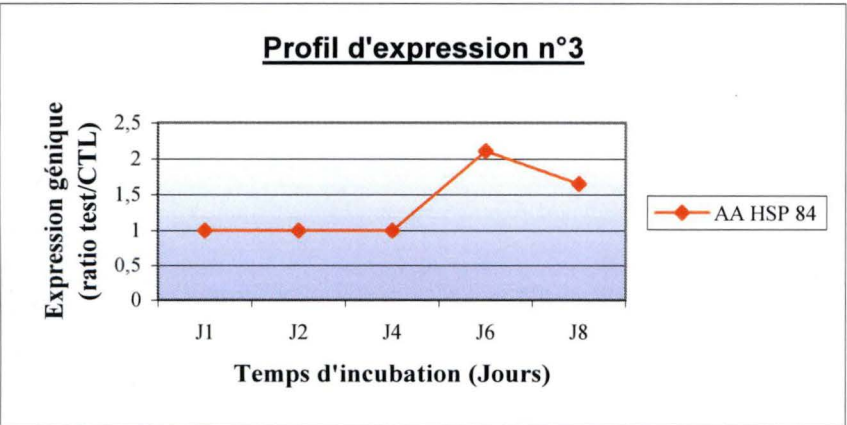
### 1.2.3 Troisième profil d'expression

Nous illustrons ici une phase de latence précédant une surexpression avec un maximum au jour 6 (figure 3.2 (B)).





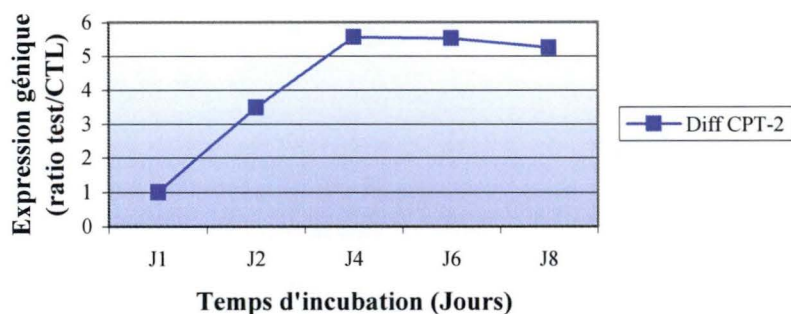
Profil d'expression n°3	
Diff	AA
CL	GLUT4*
DHAPAT	HSP 84
GPAT*	RXRα
HSP 84*	
MCAD	
p18	
PPARδ	
RXRα	
SCD-2	
SREBP-1	
VEGF A	
VEGF B	



Profil d'expression n°4	
Diff	
mtClic	
Gsn	
l-PK	

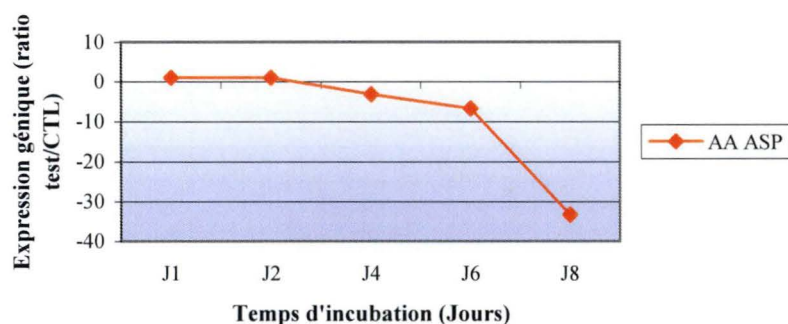
Figure 3.2 (B). Graphiques reprenant les différents profils d'expression de gènes établis à partir de la cinétique d'incubation des cellules 3T3-L1 en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM ou du cocktail pro-adipogène (Diff). Les valeurs d'expression des gènes illustrant les différents profils sont quantitatives à tous les temps d'incubation. A côté de chaque graphe, un tableau reprend les gènes dont le profil d'expression est comparable. \*: gènes dont l'expression est détectée de manière qualitative au moins à un temps au cours du traitement considéré.

### Profil d'expression n°5



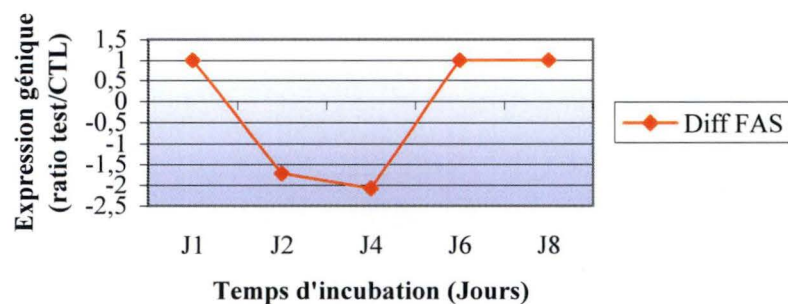
Profil d'expression n°5
<b>Diff</b>
CPT-2
HSL

### Profil d'expression n°6



Profil d'expression n°6
<b>AA</b>
ASP
Hp*
LPL-1
Pref-1
SDF-1

### Pofil d'expression n°7

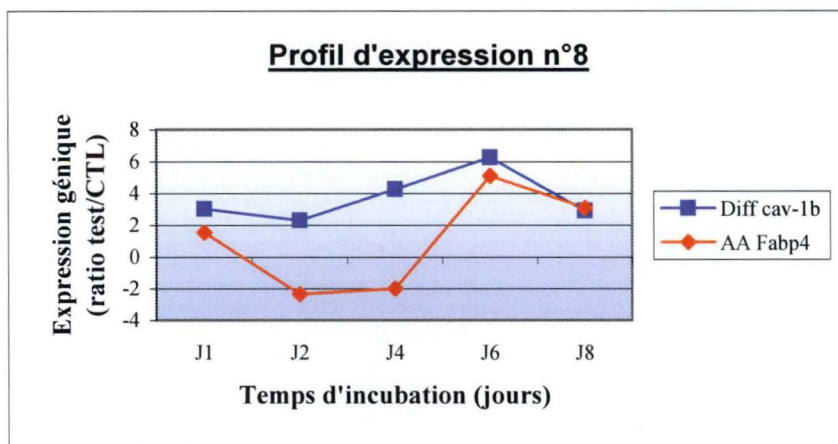


Profil d'expression n°7
<b>AA</b>
ADD1
CaMKII
ERα
FAS
Gsn
NFATC4
Smad 3

Figure 3.2 (C). Graphiques reprenant les différents profils d'expression de gènes établis à partir de la cinétique d'incubation des cellules 3T3-L1 en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM ou du cocktail pro-adipogène (Diff).

Les valeurs d'expression des gènes illustrant les différents profils sont quantitatives à tous les temps d'incubation. A côté de chaque graphe, un tableau reprend les gènes dont le profil d'expression est comparable. \*: gènes dont l'expression est détectée de manière qualitative au moins à un temps au cours du traitement considéré.





Profil d'expression n°8	
Diff	AA
cav-1 $\beta$	AGT*
Fabp4	CPT-2
GATA-2*	Fabp4
HSP 60	HSP 60
HSP 86	I-PK
LPL-1	MCAD*
p110 $\alpha$ *	PAI-1*
TF	PPAR $\gamma$
	SCD-1*
	SDF-2
	Stat 6*
	UCP-2

Figure 3.2 (D). Graphiques reprenant les différents profils d'expression de gènes établis à partir de la cinétique d'incubation des cellules 3T3-L1 en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM ou du cocktail pro-adipogène (Diff).

Les valeurs d'expression des gènes illustrant les différents profils sont quantitatives à tous les temps d'incubation. A côté de chaque graphe, un tableau reprend les gènes dont le profil d'expression est comparable.

\*: gènes dont l'expression est détectée de manière qualitative au moins à un temps au cours du traitement considéré.

De nombreux gènes présentent ce profil d'expression au cours de la différenciation adipocytaire : CL, DHAPAT, GPAT, HSP 84, MCAD, p18, PPAR $\delta$ , RXR $\alpha$ , SCD-2, SREBP-1, VEGF A et VEGF B, avec une phase de latence prenant fin au jour 2 ou 4. Par exemple, les gènes codant pour la protéine du cycle cellulaire p18, les facteurs de transcription PPAR $\delta$  et RXR $\alpha$  et les enzymes SCD-2, CL et GPAT présentent ce profil d'expression avec une période de latence prenant fin au jour 2.

Lors de l'incubation des pré-adipocytes en présence d'antimycine A, 3 gènes présentent ce profil, avec une période de latence qui s'étend généralement du jour 1 au jour 4 de la cinétique, suivie d'un pic d'expression au jour 6. Le plus intéressant est le transporteur du glucose GLUT4.

#### **1.2.4 Quatrième profil d'expression**

Au cours d'un programme de différenciation adipocytaire, l'expression des gènes codant pour mtClic, Gsn et l-PK augmente transitoirement, avec un maximum au jour 4 du programme (figure 3.2 (B)).

#### **1.2.5 Cinquième profil d'expression**

L'expression de la CPT-2 et de la HSL augmente rapidement dès le début du programme de différenciation adipocytaire, et atteint un plateau au quatrième jour (figure 3.2 (C)).

#### **1.2.6 Sixième profil d'expression**

En présence d'antimycine A, l'expression d'ASP, Hp, LPL-1, Pref-1 et SDF-1 est d'abord non modifiée pendant 2 jours dans les 3T3-L1, puis diminue à partir du jour 4 ou 6 du traitement (figure 3.2 (C)).

#### **1.2.7 Septième profil d'expression**

Au cours de l'incubation des 3T3-L1 avec l'antimycine A, plusieurs gènes subissent une diminution transitoire de leur expression (jour 2 à jour 4), parmi lesquels la FAS. Cependant, les valeurs d'expression sont relativement faibles pour l'ensemble de ces gènes (figure 3.2 (C)).

#### **1.2.8 Huitième profil d'expression**

Ce dernier profil d'expression génique illustre une expression plus variable que l'on pourrait qualifier de biphasique au cours du temps d'incubation : les gènes semblent d'abord réprimés, puis surexprimés avec un maximum au jour 6 (figure 3.2 (D)).

Parmi les gènes dont l'expression est diminuée en début de différenciation et augmentée en fin de différenciation, citons cav-1 $\beta$ , Fabp4, GATA-2, HSP 60, HSP 86, LPL-1, p110 $\alpha$  et TF. De nombreux gènes suivent également ce profil au cours du traitement des 3T3-L1 avec l'antimycine A, comme AGT, CPT-2, Fabp4, HSP 60, l-PK, MCAD, PAI-1, PPAR $\gamma$ , SCD-1, SDF-2, Stat 6 et UCP2. Cependant, comme certaines valeurs de sous- ou surexpression sont très faibles, ces résultats devront être confirmés ou infirmés par les analyses réalisées ultérieurement.



Condition	Temps	Gènes	RT-PCR	microdamier	RT-PCR/microdamier
<b>Diff</b>	J2	<i>FAS</i>	3,2	2,42	1,3
	J4	<i>FAS</i>	5,9	5,48	1,1
	J4	<i>mtClic</i>	2,5	3,11	0,8
	J4	<i>Smad 3</i>	0,16	0,61	0,3
	J8	<i>CPT-1l</i>	0,31	0,47	0,7
	J8	<i>CPT-2</i>	5,5	5,25	1,0

Condition	Temps	Gènes	RT-PCR	microdamier	RT-PCR/microdamier
<b>AA</b>	J2	<i>FAS</i>	1,4	0,58	2,4
	J4	<i>FAS</i>	0,3	0,48	0,6
	J4	<i>mtClic</i>	2	1,6	1,3
	J4	<i>Smad 3</i>	0,9	0,63	1,4
	J8	<i>CPT-1</i>	1,14	0,79	1,4

Tableau 3.3. Tableau reprenant les valeurs de l'expression relative de 5 gènes (*FAS*, *mtClic*, *Smad 3*, *CPT-1l* et *CPT-2*) obtenues par PCR en temps réel (RT-PCR) et par hybridation sur le microdamier et ce, à différents temps des programmes de différenciation adipocytaire (Diff) et d'inhibition mitochondriale en présence d'antimycine A (AA). Le rapport des expressions RT-PCR/microdamier a été calculé afin de comparer les résultats obtenus par les deux techniques. Un rapport égal ou proche de 1 signifie des quantifications relatives comparables obtenues par les deux techniques. Les expressions relatives des gènes codant pour la *CPT-1l* et la *CPT-2* ont été obtenues par PCR en temps réel respectivement par S. Vankoningsloo (thèse en cours) et M. Piens (mémoire de licence, 2002).

### 1.3 Etudes préliminaires visant à valider les résultats obtenus par l'« adipochip »

Afin de valider certains résultats d'expression obtenus avec l'« adipochip », nous avons comparé les analyses par quantifications d'expression de quelques gènes obtenues par le microdamier à celles obtenues pour des analyses par PCR en temps réel (tableau 3.3). Ce type de validation est fréquemment utilisé dans la littérature pour confirmer les résultats obtenus par les microdamiers à ADN ((Guo and Liao 2000); (Zhou, Scoggin et al. 2003)).

Nous disposons déjà de l'expression relative des gènes codant pour la CPT-11 et la CPT-2 au jour 8 de la différenciation, déterminée par PCR en temps réel respectivement par S. Vankoningsloo (thèse en cours) et M. Piens (mémoire de licence 2002). Trois candidats supplémentaires, FAS, mtClic et Smad 3, ont été choisis sur base de deux critères : leur valeur d'expression quantitative sur le microdamier présentant des sous- ou surexpressions selon la condition expérimentale et le temps considérés et la disponibilité des amorces au laboratoire. L'expression relative de ces 3 gènes a été mesurée par PCR en temps réel dans les deux conditions expérimentales et à différents temps d'incubation (tableau 3.3).

On constate que les expressions relatives obtenues par les deux techniques sont, en général, comparables pour un gène donné dans les mêmes conditions expérimentales. En effet, la surexpression ou la sous-expression des gènes observée est conservée dans les résultats obtenus par les deux techniques, sauf pour la FAS dans les cellules incubées en présence d'antimycine A à 10 nM pendant deux jours (J2). Cependant, nous avons constaté ultérieurement (à partir des données de la cinétique obtenues à l'aide du microdamier) que le gène de référence (codant pour TBP) choisi pour normaliser l'expression du gène d'intérêt dans la PCR et considéré comme un *housekeeping gene* au jour 8 de la différenciation adipocytaire, est en fait sous-exprimé au jour 2 et surexprimé au jour 6 de l'adipogenèse (annexe 1). Il est également sous-exprimé dans les cellules incubées pendant 2 jours en présence d'antimycine A. L'expression génique de la FAS obtenue par PCR en temps réel au jour 2 de l'adipogenèse et du traitement à l'antimycine A est donc probablement sur évaluée dans les deux conditions expérimentales, ce qui pourrait justifier les valeurs plus élevées obtenues par la PCR en temps réel. Par ailleurs Smad 3 est bien sous-exprimé au jour 4 de la différenciation adipocytaire, comme obtenu par les deux techniques, mais son expression relative est presque 4 fois plus faible lorsqu'elle est déterminée par PCR en temps réel. Cependant, les quantifications d'expression génique n'ont été réalisées qu'une seule fois pour les deux techniques. Des triples de mesure de l'expression génique devraient être réalisés pour chacune des deux techniques pour permettre des comparaisons plus fiables.

### 1.4 Essai d'interprétation des résultats préliminaires sur microdamier pour tenter d'expliquer l'accumulation de triglycérides induite par l'antimycine A dans des 3T3-L1

L'inhibition de l'activité respiratoire mitochondriale induit une réponse adaptative des cellules, qui expriment différenciellement de nombreux gènes afin de réorienter leur régime métabolique. La réponse adaptative de cellules soumises à un stress énergétique replacé dans un contexte de « communication rétrograde » entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau a déjà été étudiée dans plusieurs types cellulaires (Arnould, Mercy et al. 2003).

Dans ce travail, nous étudions plus particulièrement les modifications d'expression de gènes dans des pré-adipocytes 3T3-L1 en réponse à un traitement avec de l'antimycine A, et recherchons leur rôle potentiel dans l'accumulation de triglycérides induite par cet inhibiteur mitochondrial.



L'inhibition des phosphorylations oxydatives par l'animycine A oblige la cellule à produire la majorité de son ATP par la glycolyse et la fermentation lactique (Carrière *et al.*, 2004). Ceci explique notamment pourquoi l'antimycine A induit fortement l'incorporation de glucose par les cellules 3T3-L1 (A. Gilson, mémoire de licence 2004), et aussi le fait que nous observons une surexpression, bien que modérée, de gènes codant des enzymes de la glycolyse en présence de l'inhibiteur mitochondrial (+ 1,59 pour la GAPDH et + 2,13 pour la I-PK). Remarquons que le cocktail pro-adipogène stimule également l'expression de ces deux gènes (+ 2,48 pour la GAPDH et + 1,58 pour la I-PK). Ces données sont en accord avec la baisse d'ATP également induite par la dexaméthasone présente dans le cocktail pro-adipogène (S. Vankoningsloo, thèse en cours) qui inhibe les complexes I et IV de la chaîne respiratoire.

Notre première hypothèse est que l'accumulation de triglycérides induite par l'antimycine A dans les pré-adipocytes pourrait résulter de mécanismes comparables à ceux de la différenciation adipocytaire, également caractérisée, au niveau morphologique, par le stockage de triglycérides intracellulaires. En accord avec cette hypothèse, nous mesurons, en présence d'antimycine A, une surexpression, au niveau de l'abondance des transcrits, de plusieurs gènes impliqués dans l'adipogenèse, tels que GPD mit (+), DHAPAT (+ 1,64), SCD-1 (+) et PPAR $\gamma$  (+ 2,14). De plus, l'antimycine A induit également une diminution de l'expression de Pref-1 (- 2,13), un inhibiteur de l'adipogenèse dont l'expression constitutive dans les pré-adipocytes 3T3-L1 chute dès l'initiation de la différenciation (Lee, Villena *et al.* 2003). Cependant, l'antimycine A induit aussi des mécanismes antagonistes au processus d'adipogenèse des 3T3-L1, comme une répression de C/EBP $\alpha$  (-) et la surexpression de CHOP 10 (+ 5,24) et de GATA-3 (+). Ces données montrent que la transcription dépendante des C/EBPs n'est pas favorisée durant le traitement avec l'antimycine A, alors que la surexpression des membres de cette famille de facteurs de transcription (C/EBP $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ) est nécessaire et suffisante pour induire la différenciation des 3T3-L1 en adipocytes (MacDougald and Lane, 1995). Les mécanismes mis en place dans la cellule 3T3-L1 en réponse à l'inhibition de l'activité mitochondriale diffèrent donc de ceux impliqués dans l'adipogenèse des 3T3-L1.

L'augmentation d'expression des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse des triglycérides dans des 3T3-L1 traités avec l'antimycine A (+ pour la GPD mito et + 1,64 pour la DHAPAT), bien que probablement contrôlée par des mécanismes différents de l'adipogenèse et bien que relativement faible, pourrait contribuer à expliquer la formation de vésicules de triglycérides dans le cytosol. L'analyse de l'abondance ces deux protéines en Western blotting permettrait de s'assurer que leur abondance augmente bien dans les cellules incubées en présence d'antimycine A. SCD-1 est, quant à elle, impliquée dans la mono-insaturation des acides gras avant leur stockage sous forme de triglycérides : sa légère surexpression (+) mesurée en présence d'antimycine A pourrait aussi participer au stockage d'acides gras induit par l'inhibiteur mitochondrial. Des résultats intéressants ont également été obtenus pour les enzymes qui contrôlent le taux de  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras. Ainsi, l'expression de la MCAD (qui catalyse la première réaction du cycle de la  $\beta$ -oxydation) diminue (- 1,82) dans les 3T3-L1 incubés en présence d'antimycine A. Ceci suggère que le taux de  $\beta$ -oxydation est réduit par cet inhibiteur mitochondrial. De plus, l'analyse par PCR en temps réel de l'abondance relative des transcrits de la CPT-1m (non détectés sur le damier) a permis de montrer que l'expression de ce gène diminue de 50 % dans des 3T3-L1 incubés pendant 8 jours avec l'antimycine A ou avec le cocktail pro-adipogène (S. Vankoningsloo, thèse en cours). Ces résultats permettent de penser que la diminution d'expression de CPT-1m peut elle aussi contribuer à réduire le taux de  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras en diminuant leur transport dans la matrice mitochondriale. Cette hypothèse est en accord avec des mesures du taux de  $\beta$ -oxydation des acides gras réalisées dans ces conditions au laboratoire, qui montrent que l'incubation des cellules 3T3-



L1 avec l'antimycine A ou le cocktail pro-adipogène s'accompagne d'une baisse de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Nous pensons qu'il s'agit d'un processus primordial dans l'accumulation des triglycérides observés en présence d'antimycine A, mais nous devons identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette diminution de l'expression d'enzymes contrôlant le catabolisme des acides gras. On sait que la transcription de MCAD et de CPT-1m est régulée par le facteur de transcription PPAR $\gamma$  ((Gulick, Cresci et al. 1994); (Louet, Le May et al. 2001)). Conformément aux résultats décrits ci-dessus, nous avons mesuré que l'activité transcriptionnelle de PPAR $\gamma$  diminue dans les cellules 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A. La baisse d'activité de PPAR $\gamma$  induite par le stress mitochondrial pourrait donc contribuer à diminuer l'expression de MCAD et de CPT-1m, avec comme conséquence une chute du taux de  $\beta$ -oxydation des acides gras dans la mitochondrie et leur réestérification dans le cytosol où ils s'accumulent sous forme de triglycérides vésiculaires comme déjà démontré pour des cardiomyocytes en hypoxie (Huss *et al.*, 2001). Remarquons que la surexpression de PPAR $\gamma$  (+ 2,14) mesurée en présence d'antimycine A se traduit également par une nette augmentation de l'abondance de la protéine dans le cytosol, alors que son abondance nucléaire diminue (déterminé au laboratoire par Western blotting sur des lysats cellulaires et des extraits nucléaires, ainsi que par des marquages en immunofluorescence) (S. Vankoningsloo, thèse en cours). Ce phénomène a déjà été décrit dans les 3T3-L1 en cours de différenciation dans lesquels la protéine PPAR $\gamma$  cytosolique est associée aux vésicules de triglycérides en formation (Louet, Chatelain et al. 2001). Cependant, le rôle de PPAR $\gamma$  cytosolique dans la synthèse et le stockage des triglycérides est encore inconnu et devra être déterminé.

Signalons que tous les gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme des triglycérides dont l'expression est analysable par l'« adipochip », ne sont pas surexprimés dans les 3T3-L1 incubés en présence d'antimycine A. En effet, la forte sous-expression de l'ASP (- 33,33) permet d'exclure l'ASP comme effecteur impliqué dans la synthèse de triglycérides induite par l'antimycine A alors que son rôle dans l'adipogenèse est bien décrit (Cianflone 2003). Cependant, l'ASP n'est pas la seule protéine régulant le métabolisme et le stockage des triglycérides dans la cellule.

Parmi les autres gènes intéressants dont l'expression est différenciellement régulée en présence d'antimycine A, citons GLUT4. Sa légère surexpression (+) dans ces conditions suggère que ce transporteur est impliqué dans l'incorporation de glucose induite par l'antimycine A dans les 3T3-L1, ce qui a été confirmé par de nombreuses données obtenues au laboratoire.

## **2 Etude du rôle de CREB dans l'accumulation des triglycérides induite par une inhibition mitochondriale dans les pré-adipocytes 3T3-L1**

Etant donné le rôle important du facteur de transcription CREB dans l'adipogenèse des 3T3-L1 (Reusch, Colton et al. 2000), nous nous sommes intéressés, dans ce travail, au rôle potentiel de ce facteur de transcription dans l'accumulation des triglycérides induite par une inhibition des phosphorylations oxydatives dans les pré-adipocytes 3T3-L1. Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont montré que ce facteur est activé, par phosphorylation sur la Ser133, dans plusieurs types cellulaires présentant un dysfonctionnement mitochondrial (Arnould, Vankoningsloo et al. 2002). S. Vankoningsloo a également montré une activation précoce de CREB lors de l'inhibition de l'activité respiratoire dans des pré-adipocytes 3T3-L1.



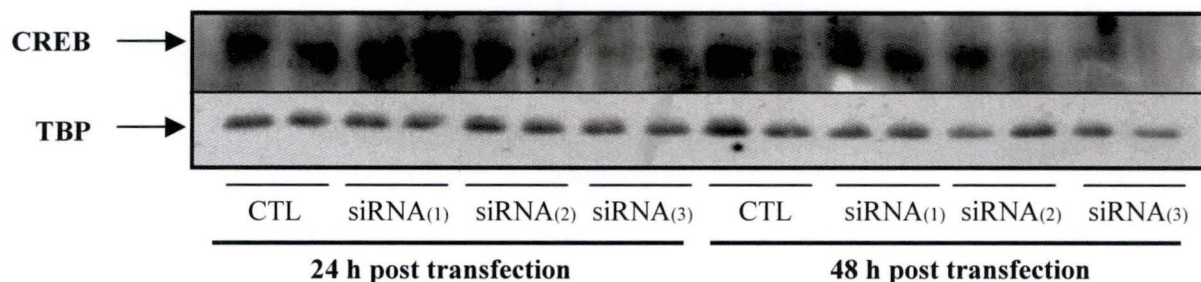
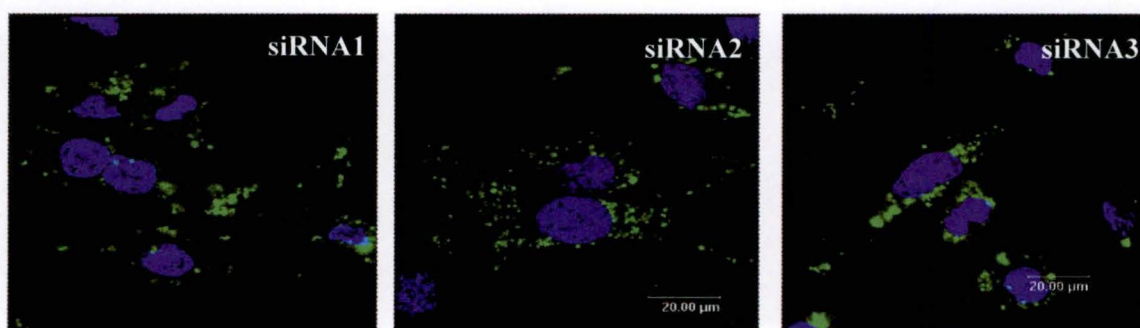


Figure 3.3. Analyse de l'abondance de CREB en Western blotting (SDS-PAGE 10 %, anticorps Rockland) réalisée sur 40 µg de lysats clairs préparés à partir de cellules 3T3-L1 préalablement transfectées ou non (CTL) pendant 4 h avec les siRNA(1), siRNA(2) et siRNA(3) à une concentration de 100 nM. Les résultats présentent les abondances de CREB obtenues pour deux tests 24 h et 48 h après la transfection. Un contrôle de charge est réalisé par l'immunodétection de TBP (TATA-box binding protein).

#### A. 24 h après la transfection



#### B. 48 h après la transfection

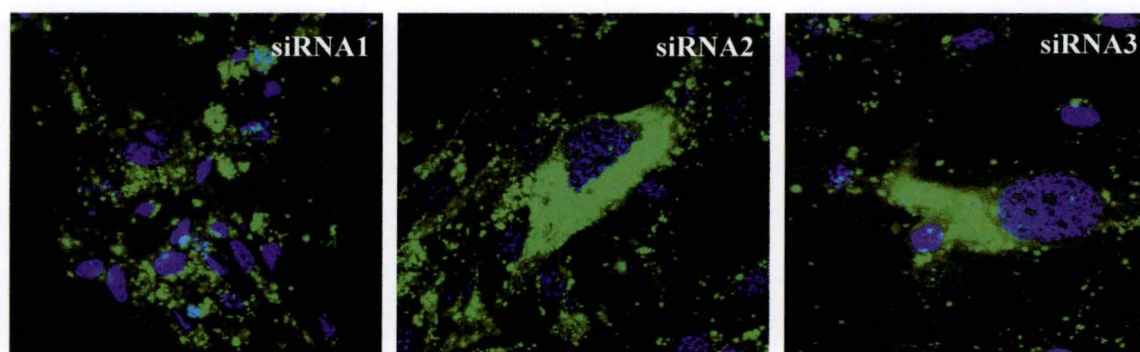


Figure 3.4. Visualisation au microscope confocal de pré-adipocytes 3T3-L1 préalablement transfectés au jetSI<sup>TM</sup> avec les siRNA(1), siRNA(2) et siRNA(3) à 20 nM. Les trois séquences siRNA(1), (2) et (3) ont été préalablement marquées à la fluorescéine et les cellules sont observées 24 h (A) et 48 h (B) après la transfection. Le noyau des cellules est marqué au To-pro-3 afin de d'estimer le nombre de cellules transfectées avec les siRNA.



Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons donc tenté de mettre en évidence l'importance de CREB dans l'accumulation de triglycérides induite par un dysfonctionnement mitochondrial dans les 3T3-L1. Pour cela, nous avons inhibé l'expression de cette protéine par le mécanisme RNAi. Après les mises au point préalables de cette technique sur des cellules 3T3-L1, nous avons testé l'effet de l'inhibition de l'expression de CREB sur l'apparition du phénotype multivésiculaire induit par l'antimycine A. Ensuite, nous avons recherché parmi les 89 gènes dont le niveau d'expression est analysable par l'« adipochip » ceux qui pourraient être régulés directement ou indirectement par CREB dans les 3T3-L1. Pour cela, nous avons analysé les modifications d'expression de gènes induites par un traitement en présence d'antimycine A dans des 3T3-L1 préalablement transfectés ou non avec un siRNA qui inhibe l'expression du gène CREB.

## 2.1 Optimisation de l'outil siRNA dans des pré-adipocytes 3T3-L1

Nous disposons de trois séquences siRNA double brins de 21 nucléotides choisies sur base de la séquence de l'ARNm de CREB de la souris (Genbank, NM133828). Ces trois siRNA ont été dessinés et synthétisés par la firme Eurogentec (Belgique). Afin de rechercher et de comparer l'effet inhibiteur des siRNA(1), (2) et (3) sur l'expression de CREB, nous avons analysé l'abondance de ce facteur de transcription par Western blotting (anticorps Rockland) à partir de lysats de pré-adipocytes 3T3-L1 préalablement transfectés ou non par électroporation avec les siRNA à la concentration de 100 nM. En effet, bien que les pré-adipocytes murins soient difficilement transfectables par les techniques classiques ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , lipofection, ...), il a été montré au laboratoire que la technique d'électroporation assure un taux de transfection des 3T3-L1 supérieur à 50 % comme déterminé, après transfection des cellules avec un plasmide codant pour la GFP (*green fluorescent protein*), par le comptage des cellules fluorescentes qui expriment la GFP rapporté à un nombre total de cellules (transfectées et non transfectées). De plus, la petite taille des siRNA permet souvent d'espérer un taux de transfection supérieur à celui obtenu avec des plasmides. L'abondance de la protéine CREB a été analysée par Western blotting après 24 h et 48 h de transfection (figure 3.3). Nous constatons, sur des doubles de transfection, que les siRNA(1) et (2), bien que complémentaires du transcrit de CREB, ont peu ou pas d'effet inhibiteur sur l'expression de CREB tant après 24 h qu'après 48 h de transfection. Par contre, dans les cellules transfectées avec le siRNA(3), on observe une nette diminution de l'abondance de la protéine CREB et ce, aux deux temps considérés. Nous avons donc choisi le siRNA(3) pour les expériences ultérieures de ce travail.

Ayant déterminé une séquence optimale permettant d'inhiber l'expression de CREB, nous avons été contraints de tester la transfection des 3T3-L1 par le jetSI<sup>TM</sup>, un vecteur de transfection lipidique cationique. En effet, des données obtenues au laboratoire ont montré que les pré-adipocytes transfectés par électroporation ne sont plus capables de se différencier. De plus, après la transfection, il est difficile de les maintenir 8 jours en présence d'un inhibiteur des phosphorylations oxydatives. Afin de déterminer le taux de transfection des pré-adipocytes 3T3-L1 avec les siRNA(1), (2) et (3) complexés au jetSI<sup>TM</sup>, nous avons marqué les siRNA avec de la fluorescéine avant de transfecter les cellules. La fluorescence émise par les cellules transfectées a ensuite été détectée au microscope confocal après 24 h et 48 h de transfection (figure 3.4). Sur base d'observations de multiples champs microscopiques, le taux de transfection des cellules avec chaque siRNA par le jetSI<sup>TM</sup> est de plus de 90 %. Cependant, bien que la majorité des cellules présentent une fluorescence intracellulaire, on observe une grande hétérogénéité dans l'accumulation cellulaire et ce, quelque soit le siRNA considéré. Nous avons donc conservé l'agent de transfection jetSI<sup>TM</sup>



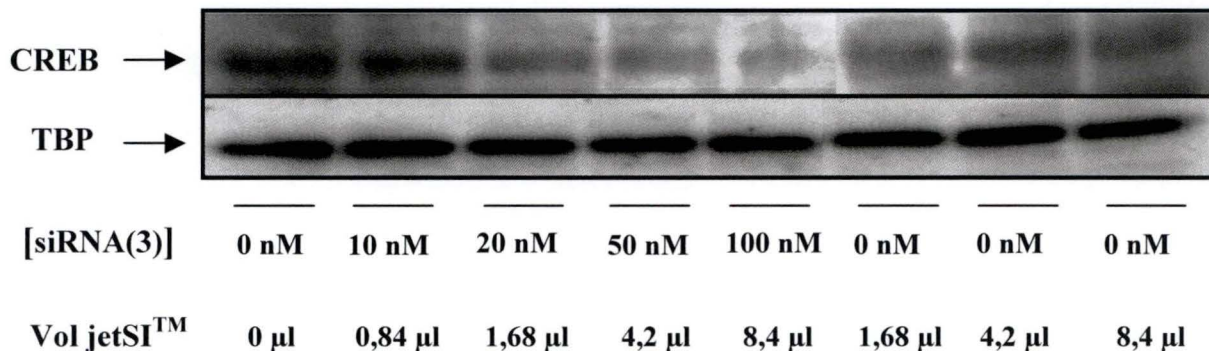


Figure 3.5. Effet du siRNA(3) sur le niveau d'expression de CREB. Les cellules 3T3-L1 ont été ou non (0 nM) transfectées au jetSI<sup>TM</sup> pendant 4 h avec des concentrations croissantes de siRNA(3) et l'abondance de la protéine CREB a été analysée par Western blotting (gel Nu-PAGE 10 %, anticorps Rockland) sur 40 µg de lysats cellulaires préparés 48 h après la transfection des cellules. Un contrôle de charge est réalisé par l'immunodétection de TBP (TATA-box binding protein).

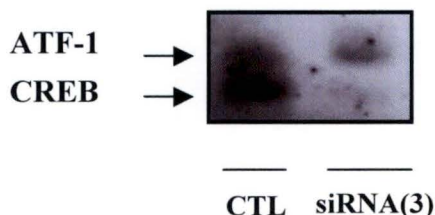


Figure 3.6. Effet différentiel du siRNA(3) sur l'expression de CREB et d'ATF-1. Les cellules 3T3-L1 ont été ou non (CTL) transfectées au jetSI<sup>TM</sup> pendant 4 h avec le siRNA(3) à 100 nM et l'abondance de la protéine CREB a été analysée par Western blotting (gel Nu-PAGE 10 %, anticorps nano Tools) sur 30 µg de lysats cellulaires préparés 24 h après la transfection des cellules.

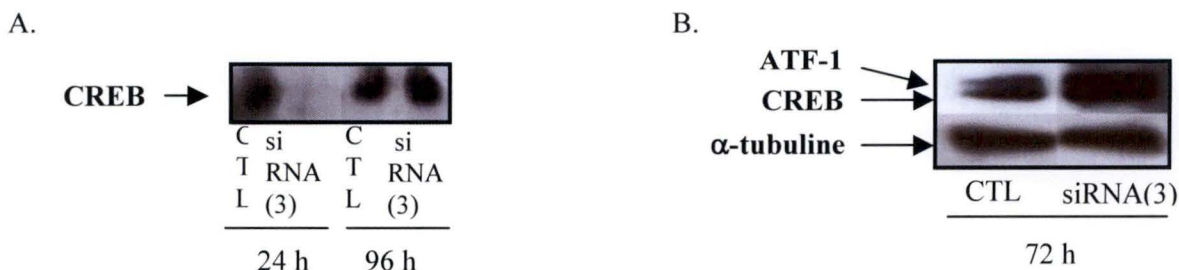


Figure 3.7. Recherche de la durée d'inhibition de l'expression de la protéine CREB par le siRNA(3). Les cellules 3T3-L1 ont été ou non (CTL) transfectées au jetSI<sup>TM</sup> avec le siRNA(3) à 100 nM et l'abondance de la protéine CREB a été analysée par Western blotting sur 30 µg de lysats cellulaires préparés (A) 24 h et 96 h après la transfection des cellules avec le siRNA(3) (gel Nu-PAGE 10 %, anticorps nano Tools) et (B) 72 h après la transfection des cellules avec le siRNA(3) (gel SDS-PAGE 10 %, anticorps nano Tools). Un contrôle de charge est réalisé par l'immunodétection de l'α-tubuline 72 h après transfection ou non des cellules avec le siRNA(3).

pour les expériences ultérieures puisqu'il permet une transfection efficace et maintien le potentiel de différenciation des 3T3-L1.

Nous avons ensuite recherché une concentration en siRNA(3) qui induit une inhibition maximale de l'expression de CREB dans les cellules 3T3-L1. Pour ce faire, nous avons analysé l'abondance de la protéine CREB en Western blotting (anticorps Rockland) 48 h après la transfection des 3T3-L1 avec des concentrations croissantes en siRNA(3) (10, 20, 50 et 100 nM) complexés au jetSI<sup>TM</sup> (figure 3.5). Afin de s'assurer que le jetSI<sup>TM</sup> n'est pas toxique pour nos cellules et qu'il n'a pas d'effet inhibiteur par lui-même sur l'expression de CREB, nous avons également incubé des cellules avec des quantités croissantes de jetSI<sup>TM</sup>, correspondant aux quantités de jetSI<sup>TM</sup> utilisées pour les transfusions des cellules avec le siRNA(3) aux concentrations de 20, 50 et 100 nM. On constate d'une part une diminution de l'abondance de CREB dépendante de la concentration en siRNA(3) utilisée. D'autre part, l'agent de transfection ne semble pas avoir d'effet cytotoxique (comme le montre le contrôle de charge pour TBP) ou inhibiteur sur l'expression de CREB, même lors de l'incubation des cellules avec la quantité maximale de jetSI<sup>TM</sup> utilisée (8,4 µl). Dans les expériences qui suivent, les 3T3-L1 ont donc été transfectés par le jetSI<sup>TM</sup> avec le siRNA(3) à la concentration de 100 nM.

Ensuite, nous avons tenté de rechercher le degré de spécificité de l'action inhibitrice du siRNA3 sur l'expression de CREB. Pour ce faire, nous avons recherché l'abondance de la protéine CREB par Western blotting sur des lysats clairs de pré-adipocytes préalablement transfectés ou non pendant 24 h avec le siRNA(3) avec un anticorps dirigé contre CREB et reconnaissant ATF-1 (anticorps nano Tools), un membre de la famille de CREB (Introduction point 2.1.1.). A la figure 3.6, on observe bien une forte diminution de l'abondance de CREB dans les cellules transfectées avec le siRNA(3) alors que le facteur ATF-1 est toujours détecté dans la même condition. Ce qui atteste d'une certaine spécificité de l'effet induit par le siRNA(3).

La dernière mise au point a consisté à déterminer la durée pendant laquelle on observe une inhibition de l'expression de CREB par le siRNA(3). Nous avons d'abord voulu savoir si l'effet observé 24 h et 48 h après la transfection des cellules avec le siRNA(3) est encore observé 96 h après la transfection (figure 3.7 (A)). On constate que l'expression de CREB est complètement inhibée par le siRNA(3) à 100 nM après 24 h de transfection mais que l'effet est perdu à 96 h. L'expression de CREB est également détectée 72 h après la transfection des cellules avec le siRNA(3) à 100 nM (figure 3.7 (B)). En conclusion, l'effet inhibiteur du siRNA(3) sur l'expression de la protéine CREB est donc transitoire et prend fin entre 48 h et 72 h après la transfection des 3T3-L1 avec le siRNA(3).

Au terme de ces mises au point, nous avons donc montré l'efficacité et une certaine spécificité d'action de la séquence siRNA(3) sur l'inhibition de l'expression du facteur de transcription CREB. Nous avons également montré que le jetSI<sup>TM</sup> assure un taux de transfection de plus de 90 % des 3T3-L1 et que l'inhibition de l'expression de CREB par le siRNA(3) à 100 nM est observée pendant au moins 48 h après la transfection des cellules.



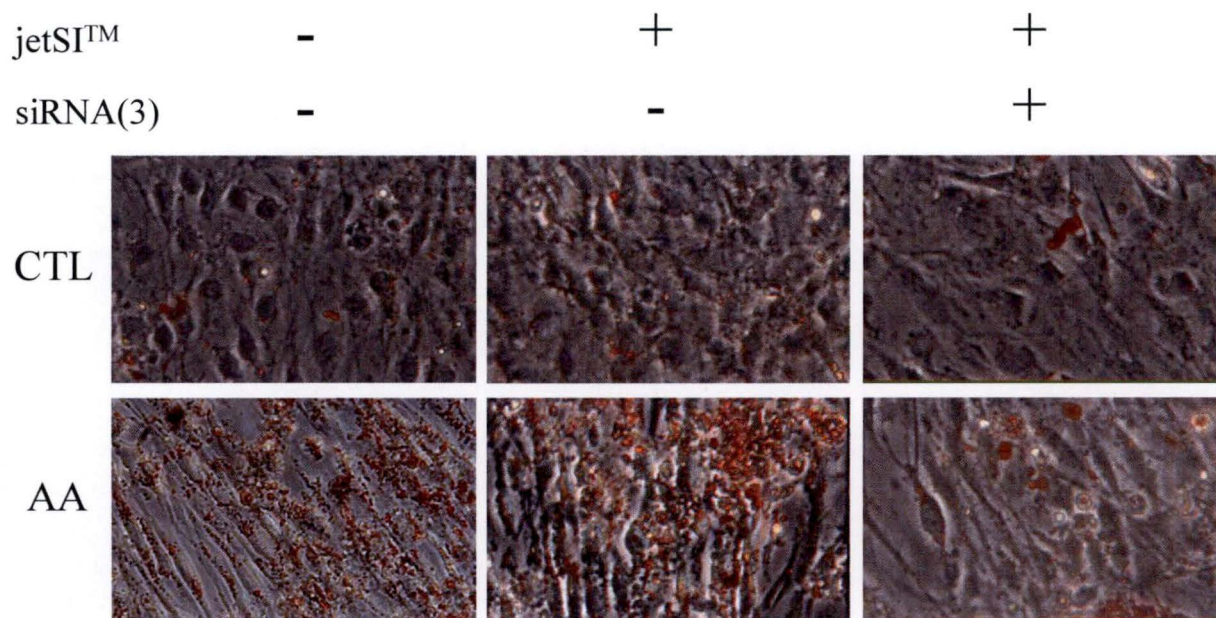


Figure 3.8. Micrographies prises au microscope à contraste de phase permettant de visualiser l'accumulation de triglycérides colorés par un test à l'Oil Red O dans le cytosol de pré-adipocytes incubés pendant 8 jours en présence ou en absence (CTL) d'antimycine A à 10 nM (AA). Trois conditions sont illustrées : des pré-adipocytes non transfectés, des pré-adipocytes préalablement incubés ou non en présence de jetSI<sup>TM</sup> pendant 4 h avant l'incubation en présence ou non d'antimycine A et des pré-adipocytes préalablement transfectés avec le siRNA(3) avant d'être incubés avec l'inhibiteur.



## 2.2 Recherche d'un rôle potentiel de CREB dans l'accumulation de triglycérides induite par un dysfonctionnement mitochondrial dans les 3T3-L1

### 2.2.1 Effet de l'inhibition de l'expression de CREB par le siRNA(3) sur le phénotype de pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A

#### 2.2.1.1 Recherche d'une éventuelle modification de l'accumulation des triglycérides induite par l'antimycine A dans des 3T3-L1 transfectés avec le siRNA(3)

Afin de rechercher un rôle éventuel de CREB dans l'accumulation de triglycérides induite par une inhibition des phosphorylations oxydatives, les pré-adipocytes 3T3-L1 ont été transfectés ou non au jetSI<sup>TM</sup> avec le siRNA(3) à 100 nM. Le lendemain, les cellules sont incubées ou non (contrôles) pendant 8 jours en présence d'antimycine A à 10 nM. Un contrôle constitué de 3T3-L1 préalablement incubés en présence de jetSI<sup>TM</sup> avant d'être incubés pendant 8 jours en présence d'antimycine A a également été réalisé. Au terme des incubations, un test de coloration des triglycérides à l'Oil Red O a été effectué afin de visualiser les triglycérides accumulés dans les pré-adipocytes au microscope à contraste de phase (figure 3.8). On observe que l'antimycine A induit la formation de nombreuses petites vésicules de triglycérides cytosoliques dans les cellules 3T3-L1. La pré-incubation des cellules en présence de jetSI<sup>TM</sup> avant le traitement avec l'antimycine A n'affecte pas l'apparition de ce phénotype multivésiculaire. Par contre, la transfection des cellules avec le siRNA(3) à 100 nM diminue l'accumulation de triglycérides induite par l'antimycine A, ce qui suggère que CREB joue un rôle dans ce phénomène. Les cellules contrôles ne semblent modifiées ni par la pré-incubation en présence de jetSI<sup>TM</sup> ni par la transfection du siRNA(3).

La quantification au spectrophotomètre à 490 nm de l'absorbance des tapis cellulaires présentée à la figure 3.11 révèle bien une diminution de 75 % de la quantité de triglycérides accumulés dans les 3T3-L1 incubés pendant 8 jours en présence d'antimycine A et préalablement transfectés avec le siRNA(3) (figure 3.9).

#### 2.2.1.2 Conclusion

La quantification des triglycérides accumulés dans des pré-adipocytes après transfection avec le siRNA(3) et incubés en présence d'antimycine A montre une diminution de 75 % de l'accumulation des triglycérides par rapport aux cellules pré-incubées en présence de jetSI<sup>TM</sup> puis incubées en présence d'antimycine A.

Cependant, nous devons ajouter que des cellules 3T3-L1 ont également été transfectées avec un siRNA non complémentaire de transcrits de cellules de mammifères (siRNA « négatif ») avant d'être incubés pendant 8 jours en présence d'antimycine A. Dans cette condition, on observe également une diminution, bien que plus faible, de la quantité de triglycérides accumulés dans le cytosol de ces cellules (résultats non montrés). Ce siRNA « négatif » semble donc également interférer avec l'accumulation de triglycérides dans les 3T3-L1 soumis à une inhibition mitochondriale. A l'heure actuelle, nous n'avons aucune donnée de l'effet du siRNA « négatif » sur le niveau d'expression de CREB. Nous ne pouvons donc pas conclure que l'effet observé du siRNA(3) est spécifique, tout comme nous ne pouvons pas conclure que l'effet médié par le siRNA « négatif » n'implique pas une contribution de CREB. Cependant, il serait intéressant et impératif de répéter cette expérience avec la séquence siRNA(1) complémentaire du transcrit de CREB et dont nous avons montré, par une analyse en Western blotting, qu'elle n'inhibe pas l'expression de CREB (figure 3.3).

Ajoutons pourtant que cette diminution de 75 % de l'accumulation des triglycérides dans le cytosol de 3T3-L1 transfectés avec le siRNA(3) et incubés pendant 8 jours avec



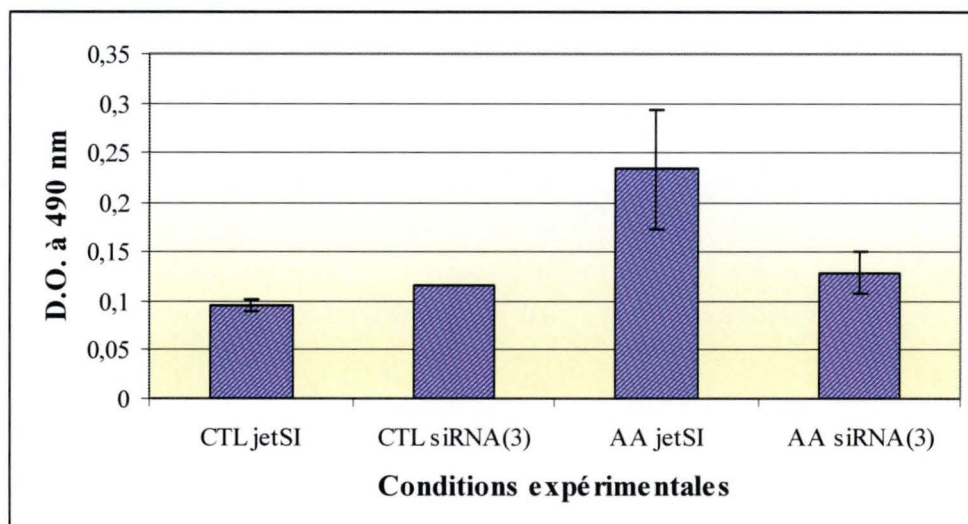


Figure 3.9. Quantification de l'accumulation de triglycérides dans le cytosol de pré-adipocytes pré-incubés pendant 4 h en présence de jetSI<sup>TM</sup> (jetSI) ou transfectés avec le siRNA(3) à 100 nM puis incubés en présence ou en absence (CTL) d'antimycine A (AA) à 10 nM pendant 8 jours. La quantification est obtenue par la mesure de l'absorbance des tapis cellulaires, au spectrophotomètre à 490 nm, après coloration des triglycérides à l'Oil Red O. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance (D.O.) à 490 nm et représentent la moyenne  $\pm$  un écart-type pour  $n=3$ .

l'antimycine A confirme des expériences antérieures réalisées au laboratoire avec des dominants négatifs de CREB. En effet, des pré-adipocytes qui surexpriment des dominants négatifs de CREB (K-CREB et M1-CREB) présentent également une diminution, d'environ 20 %, des triglycérides accumulés dans le cytosol après 8 jours d'incubation en présence d'antimycine A. Mentionnons encore que dans ces expériences, la transfection des cellules 3T3-L1 a été réalisée au Superfect qui donne des taux de transfection de 15 à 20 %.

La protéine CREB semble donc jouer un rôle potentiel dans l'accumulation de triglycérides dans des 3T3-L1 induite par une inhibition des phosphorylations oxydatives.

### **2.2.2 Effet de l'inhibition de l'expression de CREB par le siRNA(3) sur les changements d'expression de gènes observés dans des 3T3-L1 en réponse à l'antimycine A**

Nous avons montré au laboratoire que CREB est activé très rapidement dans les 3T3-L1 en réponse à une inhibition de l'activité mitochondriale (pendant les premières 48 h). Nous venons de montrer qu'une inhibition de son expression, même transitoire, perturbe l'accumulation des triglycérides induite par un dysfonctionnement mitochondrial. Il est donc possible que l'inhibition de CREB perturbe l'expression d'un certain nombre de gènes activés au début du traitement et qui contribuent à l'accumulation de triglycérides dans les 3T3-L1 en réponse à une inhibition de leur chaîne respiratoire mitochondriale par l'antimycine A.

Pour terminer ce travail, nous avons donc recherché l'effet de l'inhibition de l'expression de CREB par le siRNA(3) sur les changements d'expression de gènes observés dans des pré-adipocytes en réponse à l'antimycine A. Pour cela, nous avons transfecté ou non des cellules avec le siRNA(3) avant de les incuber pendant 4 jours en présence d'antimycine A. Nous avons choisi ce temps car les résultats obtenus pour la cinétique d'incubation des 3T3-L1 avec l'antimycine A montrent qu'une grande majorité de gènes dont l'expression est modifiée par l'inhibiteur présentent un profil d'expression comparable aux jours 4 et 8. De plus, la protéine CREB est activée rapidement en réponse à la présence d'antimycine A et nous avons montré que l'inhibition de son expression par le siRNA(3), bien que transitoire, est très forte pendant 48 h après la transfection.

Des cellules ont donc été transfectées au jetSI<sup>TM</sup> avec le siRNA(3) à 100 nM. Le lendemain, les cellules ont été incubées pendant 4 jours en présence d'antimycine A (10 nM). En parallèle, nous avons réalisé un contrôle constitué de cellules incubées en présence de jetSI<sup>TM</sup> puis incubées en présence d'antimycine A (10 nM) pendant 4 jours. Pour pouvoir rechercher les effets éventuels du jetSI<sup>TM</sup> sur l'expression de gènes, nous avons également incubé des pré-adipocytes 3T3-L1 en présence d'antimycine A (10 nM) pendant 4 jours. Les résultats obtenus dans cette dernière condition pourront donc être comparés directement aux modifications d'expression génique au jour 4 du traitement à l'antimycine A de la cinétique. Ces incubations en présence d'antimycine A ont été suivies d'une extraction d'ARN total, d'une rétrotranscription des ARNm en présence de nucléotides biotinylés et d'une hybridation des ADNc sur l'« adipochip » révélée par un anticorps antibiotine conjugué à la cyanine-3.

Le tableau 3.4 présente les résultats obtenus. Dans un premier temps, l'expression des gènes dans les cellules incubées en présence d'antimycine A a été normalisée par rapport à l'expression obtenue dans des cellules contrôles (colonne 2) puis comparée aux résultats déjà obtenus au jour 4 de la cinétique d'incubation avec l'antimycine A (colonne 1). On constate que la surexpression ou la sous-expression génique est en général bien conservée d'une expérience à l'autre avec des valeurs chiffrées comparables si l'on excepte quelques valeurs quantitatives (cav-1 $\beta$ , Fabp4, FAS, GATA-3, p18, SCD-1 et SDF-1 et 2) (tableau 3.4 (A) et (B)). Ces données valident une certaine reproductibilité des résultats pour l'expression de la majorité des gènes dans des 3T3-L1 incubés pendant 4 jours en présence d'antimycine A.



Gènes	1 AA Cinétique	2 AA	3 jetSI et AA	4 siRNA(3) et AA
AAAT	1,11	1,26	1,38	-1,19
Acrp 30	ND	ND	ND	ND
actin	1,11	1,14	1,16	1,08
ADD1	-1,54	-2,08	-1,82	-1,45
Adipsin	ND	ND	ND	ND
AGT	ND	-2,86	ND	ND
ASP	-3,12	-10,00	-7,14	-1,85
ATR I	1,13	-1,19	-1,11	-1,09
ATR II	ND	ND	ND	ND
β3-AR	ND	ND	ND	ND
CaMKII	-1,16	-1,51	-1,35	-2,00
CaMKIV	ND	ND	ND	ND
cav-1β	2,40	1,35	1,09	-1,51
cav-2	ND	ND	ND	ND
C/EBPα	ND	ND	ND	ND
C/EBPβ	-1,04	-1,18	-1,18	1,03
C/EBPδ	-1,51	-1,32	-1,43	-1,18
CHOP 10	6,61	5,81	3,68	-1,59
CL	-1,26	-1,39	-1,28	-1,85
mtClic/Clic4	1,60	1,50	1,36	-1,82
Collagen	-1,79	-2,32	-2,00	1,09
CPT-1 l	-1,27	-1,96	-1,72	-1,54
CPT-1m	ND	ND	ND	ND
CPT-2	-1,05	-1,27	-1,23	-1,09
CREB	-1,14	-1,12	-1,14	ND
Cst C	-1,07	-1,05	-1,14	-1,23
Cyclin D3	-1,10	-1,07	-1,11	-1,09
DHAPAT	ND	1,00	-1,12	1,61
eNOS	-1,33	1,18	-1,06	-1,33
ERα	-1,54	-2,04	-1,30	-1,19
Fabp 4	-2,00	1,74	2,11	3,03
FAS	-2,08	-1,27	-1,89	-1,16
GAPDH	1,04	1,06	1,04	-1,04
GATA-2	ND	-1,59	-1,07	1,13
GATA-3	ND	ND	ND	-1,30
GLUT4	-1,05	1,20	ND	ND
GPAT	ND	-1,67	ND	ND
GPD cyto	ND	ND	ND	ND
GPD mit	1,64	1,65	1,66	-2,56
Gsn	-1,79	-1,45	-1,43	-1,22
Gyk	ND	ND	ND	ND
HCNP	-1,27	-1,11	-1,02	-1,25
Hp	-1,89	-5,88	-3,22	-1,51
HSD	ND	ND	ND	ND
HSL	-1,72	-1,20	-1,14	1,11
HSP 60	2,02	1,80	1,46	-1,92
HSP 84	1,11	-1,10	-1,04	-2,08
HSP 86	1,86	1,08	1,07	1,00
IL-6	ND	ND	ND	ND
iNOS	ND	ND	ND	ND
Leptin	ND	ND	ND	ND
I-PK	1,18	1,43	-1,07	-1,64
LPL-1	-1,08	-2,22	-1,51	-3,12
MCAD	ND	-2,63	-2,44	ND
MMP2	-1,35	-1,59	-1,96	1,03
NFATC2	ND	1,22	ND	ND
NFATC4	-1,85	-1,79	-1,82	-1,33
p110α	-1,35	-1,79	ND	ND
p18	-1,02	-2,78	-1,96	-1,69

#### Légende :

ND	Non détecté
en vert	-1,5 < <1,5
qualitatif	<-26
	-26 < <-11
	-11 < <-6
	-6 < <-1,5
	1,5 < <6
	6 < <11
	11 < <26
	>26
quantitatif	+++

Tableau 3.4 (A). Tableau reprenant les valeurs d'expression des 89 gènes analysés par l'« adipochip » pour des pré-adipocytes incubés pendant 4 jours avec l'antimycine A (AA). La colonne 1 reprend les modifications d'expression génique observées au jour 4 de la cinétique d'incubation en présence d'antimycine A. La colonne 2 reprend une seconde hybridation réalisée à partir de matériel provenant de cellules incubées 4 jours avec l'antimycine A. La colonne 3 reprend les modifications d'expression génique de pré-adipocytes incubés en présence de l'agent transfectant jetSI<sup>TM</sup> puis incubés avec l'antimycine A pendant 4 jours. La colonne 4 reprend l'expression différentielle des pré-adipocytes transfectés avec le siRNA(3) pendant 4 h puis incubés pendant 4 jours avec l'antimycine A.



Comme déjà mentionné, nous n'aurons de données fiables que lorsque nous aurons des analyses réalisées en triples permettant des analyses statistiques.

Dans un second temps, afin de rechercher une éventuelle interférence du jetSI<sup>TM</sup> sur les modifications d'expression de gènes induites par l'antimycine A, les résultats d'expression de gènes dans des cellules incubées en présence de jetSI<sup>TM</sup> puis en présence d'antimycine A pendant 4 jours ont été normalisés par rapport aux valeurs d'expression de gènes de cellules contrôles incubées uniquement en présence de jetSI<sup>TM</sup> (colonne 3). Ces valeurs peuvent maintenant être comparées à l'expression différentielle des gènes dans des cellules incubées en présence d'antimycine A (colonnes 1 et 2). Nous pouvons constater que les modifications d'expression de gènes induites par l'antimycine A sont également retrouvées dans des cellules 3T3-L1 pré-incubées avec le jetSI<sup>TM</sup> avant le traitement à l'antimycine A. On constate simplement que l'expression de trois gènes sous-exprimés (« qualitativement ») au jour 4 du traitement avec l'antimycine A (l'Acrp30, l'adipsine, et la GPD cytosolique) n'est plus détectée suite à l'ajout de jetSI<sup>TM</sup> (tableau 3.4 (A)). Ceci suggère que cet agent transfectant diminue encore le niveau d'expression de ces trois gènes, et que l'abondance de leurs transcrits passe en-dessous du seuil de détection du microdamier à ADN. Par ailleurs, les niveaux d'expression de certains gènes (actine, creb, cycline D3, GAPDH et GPD mito) sont pratiquement identiques dans les 3 premières colonnes (tableau 3.4 (A)). Nous pouvons donc raisonnablement penser que l'agent transfectant jetSI<sup>TM</sup> que nous utilisons pour introduire le siRNA(3) dans la cellule n'induit que des modifications mineures de l'expression de la plupart des gènes dont l'expression est analysable sur le microdamier.

Finalement, nous pouvons analyser les modifications d'expression de gènes dans des cellules transfectées au jetSI<sup>TM</sup> avec le siRNA(3) puis incubées en présence d'antimycine A à 10 nM pendant 4 jours. Les résultats ont été normalisés par rapport aux valeurs d'expression obtenues pour des cellules incubées en présence de jetSI<sup>TM</sup> puis d'antimycine A à 10 nM pendant 4 jours (colonne 4). L'expression normalisée des gènes dans les cellules transfectées avec le siRNA(3) et incubées en présence d'antimycine A (colonne 4) peut maintenant être comparée à celle de cellules pré-incubées avec le jetSI<sup>TM</sup> puis incubées en présence d'antimycine A (colonne 3) afin de mettre en évidence des gènes dont l'expression est modifiée en présence de siRNA(3) et qui seraient donc potentiellement régulés (directement ou indirectement) par le facteur de transcription CREB.

Pour un grand nombre de gènes (par exemple codant pour la cycline D3, la GAPDH, l'HCNP, le PEDF et le RXR $\alpha$ ), nous n'observons pas ou peu de différences d'expression (tableau 3.4 (A) et (B)). Comme nous l'avons dit précédemment, l'absence d'analyse statistique des résultats ne permet pas de discuter les faibles différences obtenues. Ajoutons que l'abondance du transcrit de CREB semble diminuer dans les cellules transfectées avec le siRNA(3), puisque nous obtenons une sous-expression (-) détectée comme qualitative. C'est un argument en faveur de l'effet du siRNA(3). Rappelons que CREB est un facteur de transcription ubiquiste, qui participe au contrôle de l'expression de très nombreux gènes, en combinaison avec d'autres facteurs de transcription et de nombreux co-activateurs ou co-répresseurs. L'inhibition de l'expression de CREB par l'introduction de siRNA dans la cellule 3T3-L1 pourrait donc expliquer la diminution d'expression plus ou moins importante observée en présence du siRNA(3) que nous obtenons pour différents gènes : AAAT, CaMKII, cav-1 $\beta$ , CHOP 10, CL, mtClic, DHAPAT, GPD mito, HSP 60, HSP 84, LPL-1 et PAI-1 (tableau 3.4 (A) et (B)). La sous-expression de mtClic (- 1,82) est un argument en faveur de l'effet spécifique du siRNA(3) sur l'expression de CREB. En effet, il a été montré au laboratoire que le gène codant pour mtClic est exprimé différemment dans les cellules déplétées en ADNmt et que cette expression est régulée par CREB (Arnould *et al.*, 2003). De plus, certains des gènes cités ci-dessus présentent une forte diminution d'expression dans les cellules transfectées avec le siRNA : HSP 60 (-1,92 avec siRNA(3) vs + 1,46 avec jetSI<sup>TM</sup>),



	1	2	3	4
Gènes	AA Cinétique	AA	jetSI et AA	siRNA(3) et AA
PAI 1	++++	++++	+++	-1,75
PEDF	-1,39	-1,23	-1,28	1,09
PEPCK 1	ND	ND	ND	ND
Plin A	-1,37	-1,12	-1,10	1,80
PPAR $\delta$	1,01	1,02	-1,14	-1,30
PPAR $\gamma$	-1,30	1,23	1,10	-1,75
Pref-1	-1,85	-2,13	-1,96	1,25
RAB3D	1,45	1,06	-1,06	-
Renin	ND	1,05	ND	ND
Resistin	-	ND	ND	ND
ARNr18S	-1,04	-1,23	-1,14	1,01
RXR $\alpha$	-1,14	-1,03	1,18	-1,09
RXR $\gamma$	ND	ND	ND	ND
SCD-1	-2,00	1,30	1,07	-1,72
SCD-2	-1,75	-1,51	-1,59	-1,67
SDF-1	-1,20	-2,94	-2,32	-1,28
SDF-2	-1,16	-2,00	-2,04	-1,72
Smad 3	-1,59	-1,67	1,01	-1,09
SPARC	-1,45	-1,22	-1,11	-1,11
SREBP-1	-1,82	-1,51	-1,30	-1,23
Stat 6	-	-1,56	-1,61	-
TBP	ND	ND	ND	-
TF	1,03	-1,11	1,26	-2,56
TGF- $\beta$ 1	2,48	1,99	1,94	-1,01
TNF- $\alpha$	ND	ND	ND	ND
UCP 2	-1,56	-1,11	-1,19	-1,19
VEGF A	-1,11	1,14	1,50	-2,27
VEGF B	1,05	1,00	1,12	-1,12
VEGF C	-1,18	-1,85	-1,23	-2,00
Wnt-10b	ND	ND	ND	ND

#### Légende :

ND	Non détecté
en vert	-1,5 < <1,5
qualitatif	<-26
	-11 < <-6
	-6 < <-1,5
	1,5 < <6
	6 < <11
	11 < <26
	>26
quantitatif	quantitatif

Tableau 3.4 (B). Tableau reprenant les valeurs d'expression des 89 gènes analysés par l'« adipochip » pour des pré-adipocytes incubés pendant 4 jours avec l'antimycine A (AA). La colonne 1 reprend les modifications d'expression génique observées au jour 4 de la cinétique d'incubation en présence d'antimycine A. La colonne 2 reprend une seconde hybridation réalisée à partir de matériel provenant de cellules incubées 4 jours avec l'antimycine A. La colonne 3 reprend les modifications d'expression génique de pré-adipocytes incubés en présence de l'agent transfectant jetSI<sup>TM</sup> puis incubés avec l'antimycine A pendant 4 jours. La colonne 4 reprend l'expression différentielle des pré-adipocytes transfectés avec le siRNA(3) pendant 4 h puis incubés pendant 4 jours avec l'antimycine A.

HSP 84 (- 2,08 avec siRNA(3) vs -1,04 avec jetSI<sup>TM</sup>), PAI-1 (-1,75 avec siRNA(3) vs +++ avec jetSI<sup>TM</sup>), CHOP 10 (- 1,59 avec siRNA(3) vs + 3,68 avec jetSI<sup>TM</sup>) et GPD mito (-2,56 avec siRNA(3) vs + 1,66 avec jetSI<sup>TM</sup>). Nous terminons en discutant les résultats des sous-expressions de CHOP 10 et de GPD mito, en raison de leur rôle respectif dans la différenciation adipocytaire (Batchvarova, Wang et al. 1995) et la synthèse des triglycérides (Hajra, Larkins et al. 2000).

CHOP 10 est un dominant négatif naturel de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription C/EBP, plus particulièrement décrit pour C/EBP $\beta$ , qui jouent des rôles essentiels dans la différenciation des 3T3-L1. La forte surexpression CREB-dépendante de CHOP 10 dans les cellules incubées en présence d'antimycine A souligne une fois de plus que l'antimycine A n'induit pas les mécanismes classiques qui contrôlent l'adipogenèse, et donc que l'accumulation de triglycérides induite par cet inhibiteur mitochondrial résulte de l'activation d'autres processus cellulaires.

Le gène codant la GPD mito, sous-exprimé (- 2,56) dans les 3T3-L1 transfectés avec le siRNA(3) et incubés en présence d'AA est légèrement surexprimé aux jours 4 (+ 1,65, valeur très reproductible) et 8 (+) dans les 3T3-L1 incubés avec l'antimycine A. Le facteur de transcription CREB pourrait donc participer directement ou indirectement à la régulation de l'expression de ce gène. La GPD mito est l'enzyme qui contrôle la synthèse du glycérol-3-phosphate, précurseur des triglycérides, à partir de DHAP, un intermédiaire de la glycolyse. Il est donc possible que cette surexpression de la GPD mito, faible mais soutenue (du jour 4 à 8) dans les cellules 3T3-L1 incubées avec l'antimycine A, contribue à l'accumulation de triglycérides induite par cet inhibiteur mitochondrial. En effet, elle pourrait fournir, à partir du glucose, un substrat massivement incorporé par les 3T3-L1 soumises à un stress énergétique induit par l'antimycine A, le glycérol nécessaire pour la synthèse des triglycérides.

### 2.2.3 Conclusion

L'étude phénotypique, par un test de coloration des triglycérides à l'Oil Red O, des pré-adipocytes transfectés avec le siRNA(3) puis incubés en présence d'antimycine A pendant 8 jours a montré une diminution de 75 % de l'accumulation des triglycérides dans les cellules qui, transitoirement, n'expriment plus CREB. Nous avons poursuivi l'étude du rôle potentiel de CREB dans l'accumulation des triglycérides induite par un dysfonctionnement mitochondrial par l'analyse de l'expression différentielle de gènes essentiellement connus pour leur rôle dans la différenciation adipocytaire dans des 3T3-L1 transfectés avec le siRNA(3) puis incubées en présence d'antimycine A pendant 4 jours. On observe bien une modification de l'expression de certains gènes lors de l'inhibition de l'expression de CREB, notamment une sous-expression des gènes codant CHOP 10 et la GPD mito, respectivement impliqués dans la différenciation adipocytaire et dans la synthèse des triglycérides. Des études complémentaires devront être réalisées pour confirmer la surexpression des gènes codant pour CHOP 10 et GPD mito par PCR en temps réel dans les 3T3-L1 incubés en présence d'antimycine A, déterminer l'abondance des protéines CHOP 10 et GPD mito dans ces conditions, par exemple, par Western blotting, et rechercher la présence de séquences CRE dans le promoteur de ces deux gènes.



# Conclusion et perspectives



## Conclusion et perspectives

De nombreuses pathologies mitochondriales sont causées, entre autres, par des mutations ou des délétions dans l'ADN mitochondrial (ADNmt) qui affectent les capacités cellulaires à produire de l'ATP par les phosphorylations oxydatives (Wallace, 1999). Certaines formes de pathologies mitochondriales s'accompagnent également de perturbations du métabolisme lipidique qui peuvent avoir des conséquences comme l'apparition de certaines formes de diabète de type 2 caractérisée notamment par une résistance à l'insuline. Certains auteurs ont effectivement observé ce phénomène chez des patients diabétiques âgés et attribuent ces effets à une diminution de l'activité mitochondriale (Petersen et al., 2003).

Au niveau cellulaire, la perturbation de l'activité mitochondriale modifie donc probablement le métabolisme du glucose et des lipides mais les voies de signalisation activées et les gènes différenciellement exprimés en réponse à une inhibition de l'activité mitochondriale sont encore peu connus.

Au laboratoire, nous nous intéressons à la communication moléculaire rétrograde entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau. Par exemple, nous avons montré que CREB est un facteur de transcription activé dans de nombreux types cellulaires dont l'activité mitochondriale est altérée par une déplétion en ADNmt ou l'utilisation d'inhibiteurs métaboliques de la mitochondrie comme l'antimycine A qui cible le complexe III de la chaîne des transporteurs d'électrons (ARNOULD et al., 2002). Dans le cadre de sa thèse, S. Vankoningsloo a montré que le pré-adipocyte murin 3T3-L1 répond également aux inhibiteurs métaboliques par une activation de ce facteur de transcription et par l'accumulation de triglycérides conduisant à l'acquisition d'un phénotype multivésiculaire. Les mécanismes moléculaires responsables de ces modifications et les perturbations de la physiologie cellulaire suite à l'accumulation de triglycérides sont encore peu connus. Bien que le phénotype induit par les perturbations de l'activité mitochondriale est différent du phénotype adipocytaire, il est intéressant de comparer les mécanismes qui conduisent à l'accumulation de triglycérides dans ces deux conditions et le rôle potentiel de CREB, un facteur de transcription également décrit pour son rôle dans le contrôle de la différenciation des pré-adipocytes (REUSH...). On notera également que les modèles expérimentaux visant à étudier la réponse du pré-adipocyte à une inhibition de l'activité mitochondriale (Carriere, Carmona et al. 2004) présentent un dénominateur commun avec les modèles de différenciation de pré-adipocytes *in vitro* réalisée en présence de cocktails pro-adipogènes contenant notamment de la dexaméthasone. En effet, ce corticoïde synthétique inhibe les complexes I et IV de la chaîne respiratoire.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires sous-jacents à l'accumulation de triglycérides dans les 3T3-L1. L'objectif de ce travail était double : analyser et comparer les modifications d'expression de gènes dans des pré-adipocytes incubés en présence d'antimycine A ou d'un cocktail pro-adipogène standard (Student *et al.*, 1980) par une approche transcriptomique utilisant un microdamier à ADN développé à l'URBC en collaboration avec EAT, et rechercher le rôle potentiel du facteur CREB dans les changements phénotypiques et les modifications d'expression de gènes induits dans les pré-adipocytes en réponse à l'inhibition de l'activité mitochondriale par l'utilisation de siRNA.

Nous avons donc étudié l'expression des 89 gènes analysables par le microdamier « adipochip », portant des sondes de capture choisies sur base de gènes décrits dans la littérature comme étant spécifiquement sur- ou sous-exprimés au cours de la différenciation adipocytaire des 3T3-L1. La première analyse a porté sur la comparaison des profils de



modifications d'expression de gènes dans des pré-adipocytes incubés pendant 8 jours en présence d'antimycine A ou en présence du cocktail adipogénique. Nous avons ensuite recherché la temporalité de ces changements d'expression par des études cinétiques. Les résultats obtenus nous ont permis d'établir 8 types de profils d'expression génique au cours du temps d'incubation des cellules en présence de l'antimycine A ou du cocktail adipogénique.

Nous avons pu ainsi confirmer les modifications d'expression de nombreux gènes au cours de la différenciation des pré-adipocytes 3T3-L1 en confrontant nos résultats aux données de la littérature. Par exemple, les gènes codant pour les facteurs de transcription C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$  dont le rôle est essentiel au cours de l'adipogenèse (MacDougald and Lane, 1995) sont bien surexprimés dans cette condition de même que les gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras et des triglycérides comme la FAS, le DHAPAT, la GPAT et la GPDmito, et dans le transport des acides gras comme Fabp4. Il serait intéressant d'analyser l'abondance et/ou l'activité de certains candidats comme la GPDmito afin de vérifier l'effet de l'antimycine A sur les changements d'expression déterminés par la quantification relative de l'abondance des transcrits. L'analyse de l'abondance de la protéine pourrait être réalisée par Western blotting sur des lysats clairs provenant de 3T3-L1 incubés pendant 4 ou 8 jours en présence d'antimycine A. L'activité de la protéine pourrait être vérifiée par un dosage d'activité de l'enzyme au spectrophotomètre en suivant la consommation du NADH lors de la réaction de réduction du DHAP en glycéro-3-phosphate catalysée par la GPD mito.

Rappelons que toutes les analyses d'expression n'ont été réalisées qu'une seule fois à l'exception de l'analyse réalisée (en double) pour les modifications d'expression de gènes dans des pré-adipocytes incubés pendant 4 jours en présence d'antimycine A. Toutes ces expériences devront donc être reproduites plusieurs fois afin de pouvoir donner une signification statistique aux changements d'expression observés. Cependant, la bonne reproductibilité des données déjà obtenues pour deux expériences indépendantes est encourageante. Mentionnons également que la vérification des changements d'expression de certains candidats intéressants (comme DHAPAT et C) devra être réalisée non seulement par RT-PCR mais également au niveau de l'abondance des protéines car comme nous l'avons vu pour l'expression de Fabp4 dans les cellules incubées 8 jours en présence d'antimycine A, une corrélation entre l'abondance d'un transcrit et la protéine n'est pas toujours observée. De plus, même lorsqu'on obtient une bonne corrélation entre l'abondance d'un transcrit et la protéine (par exemple pour PPAR $\gamma$  dans la différenciation adipocytaire), une surexpression ne renseigne pas toujours d'une activité de la protéine. Pour rappel, PPAR $\gamma$  est bien surexprimé dans les cellules incubées en présence d'antimycine A mais son action transactivatrice est diminuée dans cette condition car sa localisation est cytosolique et non nucléaire (S. Vankoningsloo, thèse en cours).

L'analyse des changements d'expression de gènes dans des 3T3-L1 incubés en présence d'antimycine A pourrait permettre d'expliquer l'augmentation de l'activité de la glycolyse dans les 3T3-L1 incubés en présence d'antimycine A. En effet, on observe bien une surexpression des gènes codant pour les enzymes glycolytiques GAPDH et l-PK dans cette condition. L'augmentation de l'activité glycolytique des cellules 3T3-L1 soumises à une inhibition des phosphorylations oxydatives pourrait également contribuer à la synthèse de précurseurs utilisés dans la formation de triglycérides. L'étude des modifications d'expression génique dans les 3T3-L1 induites par l'antimycine A a également permis de proposer quelques hypothèses intéressantes pour tenter d'expliquer l'accumulation de triglycérides dans les pré-adipocytes soumis à une inhibition des phosphorylations oxydatives. Ainsi, le gène codant pour MCAD est sous-exprimé au jour 8 du traitement, ce qui pourrait conduire à une diminution de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans les 3T3-L1 et pourrait donc contribuer



à l'accumulation de triglycérides cytosoliques. Nous savons également que le gène codant la CPT-1m, une enzyme catalysant l'étape limitante d'importation des acides gras dans la mitochondrie est également sous-exprimé dans ces conditions. En outre, on observe également une sous-expression des gènes codant pour Pref-1 et GATA-2, deux inhibiteurs de la différenciation adipocytaire. Cependant, le gène codant pour le facteur de transcription C/EBP $\alpha$ , qui joue un rôle clé dans l'adipogenèse, n'est pas détecté dans la condition d'incubation en présence d'antimycine A. En conclusion, bien que certaines modifications d'expression induites par l'inhibition des phosphorylations oxydatives sont comparables à celles observées pour la différenciation adipocytaire, certains acteurs essentiels sont régulés différemment dans les deux conditions.

Comme perspective à ce travail, nous pourrions augmenter le nombre de sondes de capture en choisissant maintenant de compléter le damier à ADN de manière rationnelle par des sondes de captures correspondant à des gènes encore non analysables complémentaires de certaines voies métaboliques comme la glycolyse, la  $\beta$ -oxydation des acides gras ou la synthèse des acides gras. En effet, pour pouvoir tirer des conclusions plus fortes, il serait intéressant de voir si les modifications d'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans une même voie métabolique sont coordonnées. Ces changements coordonnés sont souvent nécessaires pour observer une réponse biologique efficace.

Au cours de l'étude des modifications d'expression génique dans les deux conditions expérimentales, l'expression de 6 gènes n'était pas détectée. Par PCR en temps réel, une technique plus sensible en raison de l'amplification par PCR, nous avons pu montrer que le niveau d'expression de ces gènes dans les 3T3-L1 est faible (Ct élevé) dans nos conditions expérimentales. Cependant, une quantification de l'expression a pu être établie pour 5 des 6 gènes, dont la leptine qui est bien surexprimée dans les adipocytes différenciés conformément à la littérature (Sliker, 1998). Une validation des résultats d'expression de 5 gènes (FAS, mtClic, Smad 3, CPT-1l et CPT-2) a également été réalisée par comparaison des niveaux d'expression obtenus à l'aide du microdamier et par PCR en temps réel. De manière générale, les changements d'expression sont comparables et les différences obtenues sont interprétables.

Notons qu'il serait intéressant d'utiliser cet outil pour étudier les modifications de l'expression de gènes dans des 3T3-L1 incubés en présence de FCCP, une molécule qui découple les mitochondries et inhibe donc les phosphorylations oxydatives mais qui n'induit pas de phénotype particulier. La comparaison des données avec les résultats obtenus pour les changements induits par l'antimycine A devrait nous aider à identifier des gènes différenciellement régulés dans ces deux conditions.

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle potentiel du facteur de transcription CREB dans l'accumulation des triglycérides dans les 3T3-L1 induite par une inhibition des phosphorylations oxydatives. En effet, ce facteur est activé très précocement en réponse à une inhibition mitochondriale (S. Vankoninsgloo, thèse en cours) et lors de la différenciation adipocytaire (REUSH). Pour cela, nous avons choisi d'inhiber l'expression de CREB en utilisant des siRNA et d'analyser les modifications phénotypiques éventuelles et les changements d'expression génique dans des 3T3-L1 transfectés avec un siRNA qui éteint l'expression du facteur CREB puis incubés en présence d'antimycine A.

Suite à des expériences de mise au point, nous avons décidé de transfecter les 3T3-L1 au jetSI<sup>TM</sup> avec le siRNA(3) qui rend le gène codant pour CREB « silencieux » à une concentration de 100 nM. Quelques tests ont également été réalisés afin de discriminer l'inhibition de l'expression de CREB par rapport à un membre de sa famille, ATF-1 et de déterminer la durée d'inhibition (environ 48 h) de l'expression de la protéine. Etant donné que



CREB est activé au cours des premières 48 h de l'inhibition mitochondriale et que nous disposons d'une fenêtre d'inhibition de l'expression de CREB de 48 h, nous avons tenté d'étudier le rôle éventuel de l'activation de CREB dans des 3T3-L1 soumis à une inhibition des phosphorylations oxydatives. Nous avons d'abord recherché l'effet de l'inhibition de CREB sur l'accumulation des triglycérides induite par l'antimycine A dans des pré-adipocytes transfectés avec le siRNA(3) par une analyse du phénotype. Nous avons ainsi constaté une diminution de l'accumulation des triglycérides (75 % dans cette condition), ce qui reflète bien l'importance de ce facteur dans la modification du phénotype des pré-adipocytes soumis à une inhibition de l'activité mitochondriale.

Pour terminer ce travail, nous avons tenté d'identifier des gènes dont l'expression est potentiellement régulée par CREB en étudiant des modifications d'expression de gènes, à l'aide de l'« adipochip », dans des 3T3-L1 transfectés avec le siRNA(3) et incubés pendant 4 jours en présence d'antimycine A. Le jetSI<sup>TM</sup> n'induisant pas de modification importante de l'expression des gènes, nous avons recherché les modifications d'expression de gènes induites par une inhibition de l'expression de CREB. Un certain nombre de gènes sont sous-exprimés dans les 3T3-L1 transfectés avec le siRNA(3) et incubés pendant 4 jours en présence d'antimycine A. Dans ce travail, nous n'avons pas accordé d'attention aux gènes présentant sous-expression trop faible. En effet, à ce stade, nous ne connaissons pas la fiabilité des données du microdamier. Cependant, certains gènes comme ceux codant pour CHOP 10 et GPDmito présentent une sous-expression marquée (respectivement - 1,59 et - 2,56). Un bon contrôle de l'effet siRNA est donné par la sous-expression obtenue pour mtClic (-1,82 versus + 1,53), un canal à chlore intracellulaire (cytosolique et mitochondrial) identifié au laboratoire comme étant surexprimé dans des cellules déplétées en ADNmt et régulé par CREB (ARNOULD 2003 FASEB).

Le gène codant pour la GPDmito est intéressant car sous-exprimé (- 2,56) dans les 3T3-L1 transfectés avec le siRNA(3) qui inhibe l'expression de CREB. En raison de la réaction catalysée par cette enzyme (la première étape de la synthèse des triglycérides à partir du glucose), elle pourrait contribuer à l'accumulation des triglycérides induite par l'antimycine A dans les 3T3-L1. La corrélation positive entre sa sous-expression lorsque CREB est réprimé et la diminution de l'accumulation de triglycérides observée dans cette condition est intéressante. De plus, pour les gènes potentiellement régulés par CREB, il serait nécessaire dans un premier temps, de rechercher l'existence de séquences consensus CRE dans leur promoteur par des études *in silico*.

En conclusion, ajoutons encore que les approches expérimentales utilisées dans ce travail qui combinent les effets des siRNA à l'analyse de l'expression de gènes par des damiers à ADN pourraient être envisagées pour d'autres facteurs de transcription comme ChREBP (carbohydrate-responsive element binding protein), un facteur de transcription activé par le xylulose-5-phosphate, un dérivé du glucose (Uyeda 2002) également activé dans les 3T3-L1 présentant un dysfonctionnement mitochondrial.



# Bibliographie



## Bibliographie

- Amri, E. Z., L. Teboul, et al. (1996). "Fatty acids regulate the expression of lipoprotein lipase gene and activity in preadipose and adipose cells." *Biochem J* **314** ( Pt 2): 541-6.
- Anderson, K. A., R. L. Means, et al. (1998). "Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta." *J Biol Chem* **273**(48): 31880-9.
- Arnould, T., L. Mercy, et al. (2003). "mtCLIC is up-regulated and maintains a mitochondrial membrane potential in mtDNA-depleted L929 cells." *Faseb J* **17**(14): 2145-7.
- Arnould, T., S. Vankoningsloo, et al. (2002). "CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation." *Embo J* **21**(1-2): 53-63.
- Batchvarova, N., X. Z. Wang, et al. (1995). "Inhibition of adipogenesis by the stress-induced protein CHOP (Gadd153)." *Embo J* **14**(19): 4654-61.
- Beale, E. G., C. Forest, et al. (2003). "Regulation of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in adipocytes." *Biochimie* **85**(12): 1207-11.
- Beltowski, J. (2003). "Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue." *Med Sci Monit* **9**(2): RA55-61.
- Bonnen, P. E., M. D. Story, et al. (2000). "Haplotypes at ATM identify coding-sequence variation and indicate a region of extensive linkage disequilibrium." *Am J Hum Genet* **67**(6): 1437-51.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brown, N. F., J. K. Hill, et al. (1997). "Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes." *Biochem J* **327** ( Pt 1): 225-31.
- Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines." *Cell* **92**(3): 351-66.
- Burton, G. R., R. Nagarajan, et al. (2004). "Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis." *Gene* **329**: 167-85.
- Butow, R. A. and N. G. Avadhani (2004). "Mitochondrial signaling: the retrograde response." *Mol Cell* **14**(1): 1-15.
- Capeau, J. (2003). "Voies de signalisation de l'insuline: mécanismes affectés dans l'insulino-résistance." *Médecine/Sciences* **19**(8-9): 834-839.
- Carriere, A., M. C. Carmona, et al. (2004). "Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: A mechanism for hypoxia-dependent effect." *J Biol Chem*.
- Choy, L., J. Skillington, et al. (2000). "Roles of autocrine TGF-beta receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation." *J Cell Biol* **149**(3): 667-82.
- Cianflone, K. (2003). "Acylation stimulating protein and triacylglycerol synthesis: potential drug targets?" *Curr Pharm Des* **9**(17): 1397-410.
- Cohen, B., D. Barkan, et al. (2001). "Leptin induces angiopoietin-2 expression in adipose tissues." *J Biol Chem* **276**(11): 7697-700.



- Collins, S. and R. S. Surwit (2001). "The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis." Recent Prog Horm Res **56**: 309-28.
- Conkright, M. D., G. Canettieri, et al. (2003). "TORCs: transducers of regulated CREB activity." Mol Cell **12**(2): 413-23.
- Dale, J. W., T. H. Tang, et al. (1997). "Conservation of IS6110 sequence in strains of *Mycobacterium tuberculosis* with single and multiple copies." Tuber Lung Dis **78**(5-6): 225-7.
- Darlington, G. J., S. E. Ross, et al. (1998). "The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation." J Biol Chem **273**(46): 30057-60.
- De Cesare, D., G. M. Fimia, et al. (1999). "Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation." Trends Biochem Sci **24**(7): 281-5.
- DiMauro, S. and E. A. Schon (2001). "Mitochondrial DNA mutations in human disease." Am J Med Genet **106**(1): 18-26.
- Dugail, I. (2001). "Transfection of adipocytes and preparation of nuclear extracts." Methods Mol Biol **155**: 141-6.
- Duplus, E. and C. Forest (2002). "Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription?" Biochem Pharmacol **64**(5-6): 893-901.
- Duplus, E., M. Glorian, et al. (2000). "Fatty acid regulation of gene transcription." J Biol Chem **275**(40): 30749-52.
- Dykxhoorn, D. M., C. D. Novina, et al. (2003). "Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 457-67.
- Elmqvist, J. K. and J. S. Flier (2004). "Neuroscience. The fat-brain axis enters a new dimension." Science **304**(5667): 63-4.
- Engeli, S., P. Schling, et al. (2003). "The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome?" Int J Biochem Cell Biol **35**(6): 807-25.
- Evans, R. M., G. D. Barish, et al. (2004). "PPARs and the complex journey to obesity." Nat Med **10**(4): 355-61.
- Febbraio, M. A. and B. K. Pedersen (2002). "Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles." Faseb J **16**(11): 1335-47.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.
- Gargiulo, C. E., S. M. Stuhlsatz-Krouper, et al. (1999). "Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane." J Lipid Res **40**(5): 881-92.
- Graeber, M. B. and U. Muller (1998). "Recent developments in the molecular genetics of mitochondrial disorders." J Neurol Sci **153**(2): 251-63.
- Gray, M. W., G. Burger, et al. (2001). "The origin and early evolution of mitochondria." Genome Biol **2**(6): REVIEWS1018.
- Greenberg, A. S., W. J. Shen, et al. (2001). "Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway." J Biol Chem **276**(48): 45456-61.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas, et al. (1998). "Understanding adipocyte differentiation." Physiol Rev **78**(3): 783-809.
- Gulick, T., S. Cresci, et al. (1994). "The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11012-6.
- Guo, X. and K. Liao (2000). "Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation." Gene **251**(1): 45-53.
- Hajra, A. K., L. K. Larkins, et al. (2000). "Induction of the peroxisomal glycerolipid-synthesizing enzymes during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. Role in triacylglycerol synthesis." J Biol Chem **275**(13): 9441-6.



- Hamm, J. K., B. H. Park, et al. (2001). "A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes." *J Biol Chem* **276**(21): 18464-71.
- Hood, D. A., P. J. Adhihetty, et al. (2003). "Mitochondrial biogenesis and the role of the protein import pathway." *Med Sci Sports Exerc* **35**(1): 86-94.
- Jayakumar, A., S. S. Chirala, et al. (1997). "Human fatty acid synthase: assembling recombinant halves of the fatty acid synthase subunit protein reconstitutes enzyme activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12326-30.
- Kaestner, K. H., J. M. Ntambi, et al. (1989). "Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase." *J Biol Chem* **264**(25): 14755-61.
- Kanety, H., R. Feinstein, et al. (1995). "Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1." *J Biol Chem* **270**(40): 23780-4.
- Klemm, D. J., J. W. Leitner, et al. (2001). "Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation." *J Biol Chem* **276**(30): 28430-5.
- Kratchmarova, I., D. E. Kalume, et al. (2002). "A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes." *Mol Cell Proteomics* **1**(3): 213-22.
- Lamson, D. W. and S. M. Plaza (2002). "Mitochondrial factors in the pathogenesis of diabetes: a hypothesis for treatment." *Altern Med Rev* **7**(2): 94-111.
- Lee, K., J. A. Villena, et al. (2003). "Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1)." *J Clin Invest* **111**(4): 453-61.
- Liao, K. and M. D. Lane (1995). "Expression of a novel insulin-activated amino acid transporter gene during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **208**(3): 1008-15.
- Lonze, B. E. and D. D. Ginty (2002). "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system." *Neuron* **35**(4): 605-23.
- Loskutoff, D. J. and F. Samad (1998). "The adipocyte and hemostatic balance in obesity: studies of PAI-1." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(1): 1-6.
- Louet, J. F., F. Chatelain, et al. (2001). "Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-independent pathway." *Biochem J* **354**(Pt 1): 189-97.
- Louet, J. F., C. Le May, et al. (2001). "Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids." *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 2): 310-6.
- Mallow, H., A. Trindl, et al. (2000). "Production of angiotensin II receptors type one (AT1) and type two (AT2) during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes." *Horm Metab Res* **32**(11-12): 500-3.
- Manduchi, E., L. M. Searce, et al. (2002). "Comparison of different labeling methods for two-channel high-density microarray experiments." *Physiol Genomics* **10**(3): 169-79.
- McLennan, H. R. and M. Degli Esposti (2000). "The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species." *J Bioenerg Biomembr* **32**(2): 153-62.
- McManus, M. T. and P. A. Sharp (2002). "Gene silencing in mammals by small interfering RNAs." *Nat Rev Genet* **3**(10): 737-47.
- Mertens, I. and L. F. Van Gaal (2002). "Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system." *Obes Rev* **3**(2): 85-101.



- Mohamed-Ali, V., L. Flower, et al. (2001). "beta-Adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: in vivo and in vitro studies." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(12): 5864-9.
- Montminy, M. (1997). "Transcriptional regulation by cyclic AMP." *Annu Rev Biochem* **66**: 807-22.
- Montoya, J., A. Perez-Martos, et al. (1997). "Regulation of mitochondrial transcription by mitochondrial transcription factor A." *Mol Cell Biochem* **174**(1-2): 227-30.
- Moon, Y. A., N. A. Shah, et al. (2001). "Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins." *J Biol Chem* **276**(48): 45358-66.
- Mootha, V. K., J. Bunkenborg, et al. (2003). "Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria." *Cell* **115**(5): 629-40.
- Morrison, R. F. and S. R. Farmer (2000). "Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation." *J Nutr* **130**(12): 3116S-3121S.
- Moss, E. G. and J. M. Taylor (2003). "Small-interfering RNAs in the radar of the interferon system." *Nat Cell Biol* **5**(9): 771-2.
- Munoz-Malaga, A., J. Bautista, et al. (2000). "Lipomatosis, proximal myopathy, and the mitochondrial 8344 mutation. A lipid storage myopathy?" *Muscle Nerve* **23**(4): 538-42.
- Nadler, S. T., J. P. Stoehr, et al. (2000). "The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11371-6.
- Nisoli, E., L. Regianini, et al. (2002). "Multiple symmetric lipomatosis may be the consequence of defective noradrenergic modulation of proliferation and differentiation of brown fat cells." *J Pathol* **198**(3): 378-87.
- Ntambi, J. M. and K. Young-Cheul (2000). "Adipocyte differentiation and gene expression." *J Nutr* **130**(12): 3122S-3126S.
- Paz, K., R. Hemi, et al. (1997). "A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* **272**(47): 29911-8.
- Pessin, J. E., D. C. Thurmond, et al. (1999). "Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location!" *J Biol Chem* **274**(5): 2593-6.
- Petersen, K. F., D. Befroy, et al. (2003). "Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance." *Science* **300**(5622): 1140-2.
- Portha, B. (2003). "Anomalies programmées de la sécrétion d'insuline dans le diabète de type 2: le paradigme du rat GK." *Médecine/Sciences* **19**(8-9): 847-853.
- Poulton, J. and L. Bindoff (2001). "Mitochondrial Respiratory Chain Disorders." *Encyclopedia of Life Sciences*: 1-8.
- Reusch, J. E., L. A. Colton, et al. (2000). "CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells." *Mol Cell Biol* **20**(3): 1008-20.
- Rial, E., E. Aguirregoitia, et al. (2004). "Alkylsulfonates activate the uncoupling protein UCP1: implications for the transport mechanism." *Biochim Biophys Acta* **1608**(2-3): 122-30.
- Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2000). "Molecular regulation of adipogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 145-71.
- Schena, M., D. Shalon, et al. (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science* **270**(5235): 467-70.
- Scherer, P. E., R. Y. Lewis, et al. (1997). "Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo." *J Biol Chem* **272**(46): 29337-46.



- Schramke, V. and R. Allshire (2003). "Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing." *Science* **301**(5636): 1069-74.
- Shaywitz, A. J. and M. E. Greenberg (1999). "CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals." *Annu Rev Biochem* **68**: 821-61.
- Slieker, L. J., K. W. Sloop, et al. (1998). "Differentiation method-dependent expression of leptin in adipocyte cell lines." *Biochem Biophys Res Commun* **251**(1): 225-9.
- Smas, C. M., L. Chen, et al. (1999). "Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation." *J Biol Chem* **274**(18): 12632-41.
- Sniderman, A. D., K. Cianflone, et al. (1998). "The adipocyte, fatty acid trapping, and atherogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(2): 147-51.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, et al. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." *Nature* **409**(6818): 307-12.
- Student, A. K., R. Y. Hsu, et al. (1980). "Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes." *J Biol Chem* **255**(10): 4745-50.
- Susulic, V. S., R. C. Frederich, et al. (1995). "Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene." *J Biol Chem* **270**(49): 29483-92.
- Swergold, G. D., O. M. Rosen, et al. (1982). "Hormonal regulation of the phosphorylation of ATP citrate lyase in 3T3-L1 adipocytes. Effects of insulin and isoproterenol." *J Biol Chem* **257**(8): 4207-15.
- Tachibana, T., T. Takagi, et al. (2003). "Beta 3-adrenergic receptor is involved in feeding regulation in chicks." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **135**(3): 403-9.
- Tang, Q. Q. and M. D. Lane (2000). "Role of C/EBP homologous protein (CHOP-10) in the programmed activation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta during adipogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23): 12446-50.
- Tontonoz, P., E. Hu, et al. (1995). "PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene." *Mol Cell Biol* **15**(1): 351-7.
- Trayhurn, P. (2003). "Leptin--a critical body weight signal and a "master" hormone?" *Sci STKE* **2003**(169): PE7.
- Tsao, T. S., H. F. Lodish, et al. (2002). "ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism." *Eur J Pharmacol* **440**(2-3): 213-21.
- Uyeda, K., H. Yamashita, et al. (2002). "Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage." *Biochem Pharmacol* **63**(12): 2075-80.
- Uysal, K. T., L. Scheja, et al. (2000). "Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2." *Endocrinology* **141**(9): 3388-96.
- Virkamaki, A., K. Ueki, et al. (1999). "Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance." *J Clin Invest* **103**(7): 931-43.
- Wadzinski, B. E., W. H. Wheat, et al. (1993). "Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation." *Mol Cell Biol* **13**(5): 2822-34.
- Wallace, D. C. (1999). "Mitochondrial diseases in man and mouse." *Science* **283**(5407): 1482-8.
- Weiss, G. H., O. M. Rosen, et al. (1980). "Regulation of fatty acid synthetase concentration and activity during adipocyte differentiation. Studies on 3T3-L1 cells." *J Biol Chem* **255**(10): 4751-7.
- Welsh, G. I., M. R. Griffiths, et al. (2004). "Proteome analysis of adipogenesis." *Proteomics* **4**(4): 1042-51.
- Wollheim, C. B. (2000). "Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in type II diabetes." *Diabetologia* **43**(3): 265-77.

- Zamore, P. D., T. Tuschl, et al. (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." Cell **101**(1): 25-33.
- Zancanaro, C., A. Sbarbati, et al. (1990). "Multiple symmetric lipomatosis. Ultrastructural investigation of the tissue and preadipocytes in primary culture." Lab Invest **63**(2): 253-8.
- Zeng, Y., R. Yi, et al. (2003). "MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9779-84.
- Zhang, J. W., D. J. Klemm, et al. (2004). "Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis." J Biol Chem **279**(6): 4471-8.
- Zhou, A., S. Scoggin, et al. (2003). "Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference." Oncogene **22**(13): 2054-64.
- Zhu, Y., H. L. Liao, et al. (2000). "Lipoprotein promotes caveolin-1 and Ras translocation to caveolae: role of cholesterol in endothelial signaling." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(11): 2465-70.



# Annexes



# Annexe 1

## 1 Valeurs obtenues pour l'expression différentielle de gènes au cours de la cinétique d'incubation des cellules 3T3-L1 en présence du cocktail adipogénique (Diff)

Gènes	Diff 1J	Diff 2J	Diff 4 J	Diff 6 J	Diff 8 J
AAAT	1,89	3,66	4,93	4,92	3,49
Acrp 30	ND	-1,54	10,08	++++	++++
actin	-1,10	+	-1,19	1,18	-1,69
ADD1	-1,43	1,00	-1,28	1,62	-1,85
Adipsin	ND	-1,41	3,14	29,49	70,25
AGT	1,22	4,12	27,47	28,03	14,55
ASP	-2,00	+	1,06	1,25	1,34
ATR I	1,04	1,96	-1,11	1,02	-1,28
ATR II	ND	-2,70	ND	----	ND
β3-AR	ND	ND	ND	+	+
CaMKII	-1,37	-1,33	-1,41	1,37	-2,86
CaMKIV	ND	ND	ND	ND	ND
cav-1β	3,04	2,31	4,27	6,26	2,91
cav-2	ND	ND	ND	++++	4,30
C/EBPα	-1,11	1,87	10,57	14,12	12,86
C/EBPβ	-1,03	1,19	1,17	-1,07	-1,05
C/EBPδ	-1,14	2,93	1,38	1,14	-1,32
CHOP 10	-1,11	-1,72	-1,79	1,27	1,01
CL	-1,02	1,37	1,65	2,58	1,56
mtClic/Clic4	1,70	1,74	3,11	2,47	1,85
Collagen	1,08	2,22	2,04	2,53	1,81
CPT-1 l	-1,69	-1,37	-	1,07	-2,13
CPT-1m	ND	ND	ND	ND	ND
CPT-2	1,05	3,48	5,56	5,53	5,25
CREB	+	-1,19	ND	1,89	-1,32
Cst C	-1,37	+	-1,51	1,29	-1,89
Cyclin D3	-1,07	1,65	1,89	2,00	1,65
DHAPAT	1,11	1,43	6,19	9,49	5,41
eNOS	1,20	1,21	1,15	-1,23	-1,06
ERα	-2,63	1,12	1,24	2,03	1,52
Fabp 4	4,60	1,94	10,27	68,92	40,83
FAS	1,00	2,42	5,48	10,10	4,99
GAPDH	-1,01	1,92	1,52	1,78	2,48
GATA-2	-	-	---	-	-
GATA-3	---	ND	ND	ND	--
GLUT4	ND	1,01	1,54	3,60	--
GPAT	+	1,28	2,51	6,62	2,91
GPD cyto	ND	2,03	13,93	++++	++++
GPD mit	1,25	-1,20	1,63	+	1,28
Gsn	1,10	2,10	2,06	2,22	1,13
Gyk	ND	ND	ND	++++	ND
HCNP	-1,45	+	1,22	1,97	-1,07
Hp	1,58	8,98	10,88	10,05	3,55
HSD	ND	+	++++	++++	18,90
HSL	-1,15	1,19	2,84	6,28	6,20
HSP 60	3,38	1,96	4,19	8,57	3,41
HSP 84	1,01	+	1,97	2,24	-1,10
HSP 86	4,78	1,42	-1,43	4,34	-1,27
IL-6	ND	ND	ND	ND	ND
iNOS	ND	-	ND	ND	ND
Leptin	ND	ND	ND	ND	ND
I-PK	1,03	1,80	2,35	1,51	1,58
LPL-1	1,16	-1,54	1,39	9,34	1,84
MCAD	1,71	1,42	3,29	10,18	2,96
MMP2	1,41	2,10	-1,02	2,44	-1,72
NFATC2	ND	1,75	ND	ND	-
NFATC4	-1,56	-1,02	-1,27	2,13	1,06
p110α	+	-1,56	-	2,70	-1,33

### Légende :

ND	Non détecté
en vert	-1,5 < <1,5
qualitatif	<-26
	-26 < <-11
	-11 < <-6
	-6 < <-1,5
	1,5 < <6
	6 < <11
	11 < <26
	>26
quantitatif	----
	---
	--
	-
	+
	++
	+++
	++++



Gènes	Diff 1J	Diff 2J	Diff 4 J	Diff 6 J	Diff 8 J
p18	-1,07	1,03	5,11	7,60	2,96
PAI 1	ND	ND	ND	ND	+
PEDF	-1,69	+	-3,85	-1,64	-2,78
PEPCK 1	ND	ND	ND	ND	ND
Plin A	1,13	-1,05	1,28	1,91	1,15
PPAR $\delta$	1,01	1,25	2,46	2,61	1,90
PPAR $\gamma$	1,85	2,45	8,76	14,87	18,09
Pref-1	-1,41	+	-4,17	-2,27	-5,00
RAB3D	ND	1,30	1,74	+	+
Renin	ND	ND	ND	ND	ND
Resistin	ND	1,71	22,59	++++	++++
ARNr18S	-1,20	+	-1,18	1,14	-1,72
RXR $\alpha$	1,01	1,30	1,63	2,41	1,03
RXR $\gamma$	ND	ND	+	ND	-
SCD-1	1,21	1,86	23,15	123,96	164,38
SCD-2	-1,16	1,06	4,78	7,97	6,89
SDF-1	-2,32	-1,33	-1,79	1,29	-3,45
SDF-2	-3,57	-2,38	-3,57	-1,16	-7,69
Smad 3	-1,67	-1,79	-1,64	1,10	-1,69
SPARC	-1,69	+	-1,23	1,15	-1,92
SREBP-1	-1,18	1,97	1,56	3,38	1,71
Stat 6	-1,14	1,21	1,36	2,03	-1,04
TBP	ND	-	ND	+	ND
TF	-1,59	-2,44	-2,32	2,04	-3,03
TGF- $\beta$ 1	-1,56	1,86	1,63	2,62	1,59
TNF- $\alpha$	ND	ND	ND	ND	ND
UCP 2	-1,09	2,16	1,95	3,13	3,56
VEGF A	-1,64	-1,22	1,44	4,06	3,01
VEGF B	-1,04	-1,04	1,15	2,46	-1,11
VEGF C	-1,82	-1,18	-	-1,85	-6,25
Wnt-10b	ND	ND	ND	ND	ND

**Légende :**

ND	Non détecté
en vert	-1,5 < <1,5
qualitatif	<-26
	-26 < <-11
	-11 < <-6
	-6 < <-1,5
	1,5 < <6
	6 < <11
	11 < <26
	>26
quantitatif	----
	---
	-
	+
	++
	+++
	++++

## 2 Valeurs obtenues pour l'expression différentielle de gènes au cours de la cinétique d'incubation des cellules 3T3-L1 en présence d'antimycine A (AA)

Gènes	AA 1J	AA 2J	AA 4 J	AA 6 J	AA 8 J
AAAT	+	-1,43	1,11	1,15	1,59
Acrp 30	ND	---	----	ND	ND
actin	1,15	-1,72	1,11	1,40	1,41
ADD1	-1,16	-2,33	-1,54	-1,06	-1,28
Adipsin	ND	--	---	--	--
AGT	1,06	-2,17	-	2,42	-
ASP	-1,25	-1,39	-3,12	-6,67	-33,33
ATR I	1,21	-1,54	1,13	1,32	1,54
ATR II	ND	----	ND	----	----
β3-AR	ND	ND	ND	ND	ND
CaMKII	1,30	-2,08	-1,16	1,44	1,23
CaMKIV	ND	ND	ND	ND	ND
cav-1β	-1,10	-1,43	2,40	2,64	3,83
cav-2	ND	ND	ND	ND	ND
C/EBPα	-	-	-	ND	-
C/EBPβ	1,12	1,10	-1,04	1,42	1,18
C/EBPδ	1,53	-1,43	-1,51	1,06	-1,08
CHOP 10	2,21	4,12	6,61	6,74	5,24
CL	1,08	-1,92	-1,26	1,56	1,41
mtClic/Clic4	1,29	-1,01	1,60	1,77	1,99
Collagen	-1,30	-2,78	-1,79	-2,79	-1,79
CPT-1 I	-	-	-1,27	-1,10	-1,14
CPT-1m	ND	ND	ND	ND	ND
CPT-2	1,29	-3,03	-1,05	1,52	1,38
CREB	ND	-1,32	-1,14	1,64	1,31
Cst C	-1,01	-1,02	-1,07	1,69	-1,01
Cyclin D3	1,53	1,04	-1,10	1,04	1,02
DHAPAT	1,36	-1,69	ND	2,01	1,64
eNOS	1,34	-1,79	-1,33	1,16	1,25
ERα	1,07	-6,67	-1,54	1,07	1,05
Fabp 4	1,54	-2,33	-2,00	5,10	3,10
FAS	-1,15	-1,72	-2,08	1,04	-1,19
GAPDH	-1,14	-1,35	1,04	1,62	1,59
GATA-2	-1,20	-2,33	-	1,00	ND
GATA-3	ND	1,05	ND	+	+
GLUT4	1,20	-1,28	-1,05	2,45	+
GPAT	ND	-	-	1,39	ND
GPD cyto	ND	-	---	ND	ND
GPD mit	1,72	1,46	1,64	+	+
Gsn	-1,37	-2,13	-1,79	1,01	1,07
Gyk	ND	ND	ND	ND	ND
HCNP	1,06	-1,09	-1,27	1,47	1,47
Hp	-1,15	-1,52	-1,89	-2,86	--
HSD	ND	ND	ND	ND	ND
HSL	-1,28	-1,27	-1,72	1,18	-1,22
HSP 60	2,07	1,39	2,02	4,40	3,70
HSP 84	1,36	1,22	1,11	2,11	1,65
HSP 86	1,08	1,26	1,86	2,00	3,45
IL-6	ND	ND	ND	ND	ND
iNOS	ND	ND	ND	ND	ND
Leptin	ND	ND	ND	ND	ND
I-PK	-1,01	-1,56	1,18	2,77	2,13
LPL-1	1,38	-1,54	-1,08	-2,04	-2,94
MCAD	-1,09	-5,26	-	-	-1,82
MMP2	1,04	1,52	-1,35	1,36	-2,33
NFATC2	+	-1,20	ND	ND	ND
NFATC4	-1,22	-2,38	-1,85	1,12	-1,39
p110α	ND	-	-1,35	1,24	ND

### Légende :

ND	Non détecté
en vert	-1,5 < 1,5
qualitatif	< -26
	-26 < -11
	-11 < -6
	-6 < -1,5
	1,5 < 6
	6 < 11
	11 < 26
	> 26
quantitatif	----
	---
	--
	-
	+
	++
	+++
	++++



Gènes	AA 1J	AA 2J	AA 4 J	AA 6 J	AA 8 J
p18	-1,70	-2,86	-1,02	-	-
PAI 1	+++	+	++++	++++	++++
PEDF	1,12	-1,18	-1,39	-1,72	-1,67
PEPCK 1	ND	ND	ND	ND	ND
Plin A	1,13	-1,18	-1,37	1,76	1,13
PPAR $\delta$	1,14	-1,43	1,01	1,87	1,32
PPAR $\gamma$	1,58	-2,33	-1,30	2,39	2,14
Pref-1	-1,20	-1,33	-1,85	-2,04	-2,13
RAB3D	1,25	-1,43	1,45	+	1,04
Renin	ND	-1,16	ND	+	+
Resistin	ND	-	-	ND	ND
ARNr18S	-1,43	-1,49	-1,04	1,24	-1,14
RXR $\alpha$	1,00	-1,02	-1,14	2,07	1,21
RXR $\gamma$	ND	1,01	ND	ND	ND
SCD-1	1,18	1,66	-2,00	1,73	+
SCD-2	1,00	-1,51	-1,75	-1,64	1,29
SDF-1	-1,07	-1,69	-1,20	-3,12	-4,76
SDF-2	1,52	-2,27	-1,16	-1,23	-2,33
Smad 3	1,00	-2,27	-1,59	-1,03	-1,23
SPARC	1,20	-1,11	-1,45	-1,54	-1,59
SREBP-1	1,27	-1,67	-1,82	1,23	-1,16
Stat 6	1,16	-3,12	-	1,22	-
TBP	ND	-	ND	ND	ND
TF	1,37	-1,72	1,03	1,64	-1,01
TGF- $\beta$ 1	1,50	2,57	2,48	5,05	3,90
TNF- $\alpha$	ND	ND	ND	ND	ND
UCP 2	-1,19	-2,94	-1,56	1,58	1,45
VEGF A	1,34	-1,23	-1,11	1,83	1,68
VEGF B	1,24	1,45	1,05	1,65	1,26
VEGF C	1,04	-2,38	-1,18	-2,13	-2,04
Wnt-10b	ND	ND	ND	ND	ND

**Légende :**

ND Non détecté

en vert -1,5 &lt; &lt;1,5

qualitatif

&lt;-26

-26 &lt; &lt;-11

-11 &lt; &lt;-6

-6 &lt; &lt;-1,5

1,5 &lt; &lt;6

6 &lt; &lt;11

11 &lt; &lt;26

&gt;26

quantitatif

SECRETARIAT BIOLOGIE  
F.U.N.D.P.

Rue de Bruxelles, 59  
B 5000 NAMUR (Belgique)  
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

25 AOUT 2004